



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ-ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ»**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«Πρότυπο μεθυλίωσης σε επαγόμενα βλαστοκύτταρα»**

**ΒΑΡΣΟΥ ΜΑΓΔΑΛΗΝΗ**

**ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ - ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ**

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

ΑΣΠΑΣΙΑ ΤΣΕΖΟΥ, Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής Παν/μιου Θεσσαλίας, Επιβλέπουσα

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΔΗΜΑΣ, Αν. Καθηγητής Φαρμακολογίας Παν/μιου Θεσσαλίας, Μέλος τριμελούς επιτροπής

ΜΑΡΙΑ ΤΖΕΤΗ, Καθηγήτρια Γενετικής, Ιατρική Σχολή ΕΚΠΑ, Μέλος τριμελούς επιτροπής

**ΛΑΡΙΣΑ, 2021**



**UNIVERSITY OF THESSALY  
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES  
FACULTY OF MEDICINE**



**Laboratory of Cytogenetics and Molecular Genetics**

**POSTGRADUATE MASTER PROGRAM  
“HUMAN GENETICS – GENETIC COUNSELING”**

**MASTER’S THESIS  
« DNA methylation in induced pluripotent stem cells »**

**VARSOU MAGDALINI  
BIOCHEMIST - BIOTECHNOLOGIST**

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος «Γενετική του Ανθρώπου – Γενετική Συμβουλευτική» του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επιβλέπουσα Καθηγήτρια κ. Ασπασία Τσέζου, Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής Παν/μιου Θεσσαλίας και υπεύθυνη του μεταπτυχιακού προγράμματος, για την ανάθεση της συγκεκριμένης εργασίας, την πολύτιμη καθοδήγηση και την άψογη συνεργασία. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής, τον κ. Κωνσταντίνο Δήμα, Αν. Καθηγητή Φαρμακολογίας Παν/μιου Θεσσαλίας και την κ. Μαρία Τζέτη, Καθηγήτρια Γενετικής, Ιατρική Σχολή ΕΚΠΑ, για την επίβλεψη της διπλωματικής μου εργασίας. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την ηθική υποστήριξη και τη συμπαράσταση που μου προσφέρει καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μετατροπή των διαφοροποιημένων σωματικών κυττάρων σε ολοδύναμα βλαστικά κύτταρα μέσω της υπερέκφρασης παραγόντων επαναπρογραμματισμού συνεπάγεται την επιγενετική αναδιαμόρφωση τους. Η μεθυλίωση του DNA στα επαγόμενα ολοδύναμα βλαστικά κύτταρα (iPSCs) διαφέρει από εκείνη των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων (ESCs) σε ένα σημαντικό ποσοστό των θέσεων CpG. Το εάν διαφορετικά σύνολα παραγόντων επαναπρογραμματισμού επηρεάζουν τον τύπο και την έκταση της παρεκκλίνουσας μεθυλίωσης του DNA στα iPSCs αποτελεί ευρύ πεδίο έρευνας. Ειδικότερα, έχουν παραχθεί ανθρώπινα iPSCs από ινοβλάστες χρησιμοποιώντας είτε τους παράγοντες Yamanaka (OCT4, SOX2, KLF4 και cMYC) είτε τους παράγοντες Thomson (OCT4, SOX2, NANOG και LIN28) και έχουν προσδιοριθεί τα προφίλ μεθυλίωσης του DNA τους σε όλο το γονιδίωμα. Εκτός από τις κοινές παρεκκλίσεις μεθυλίωσης του DNA που υπάρχουν σε όλα τα iPSCs, εντοπίστηκαν επαναλαμβανόμενες παρεκκλίσεις μεθυλίωσης του DNA ειδικές για τα Yamanaka-iPSCs (Y-iPSC) και για τα Thomson-iPSCs (T-iPSC). Παραδόξως, όχι μόνο οι γονιδιωματικές θέσεις των παρεκκλίσεων ήταν διαφορετικές αλλά και οι τύποι τους. Ειδικότερα, ο επαναπρογραμματισμός με τους παράγοντες Yamanaka οδήγησε κυρίως στην αποτυχία απομεθυλίωσης των CpGs, ενώ ο επαναπρογραμματισμός με τους παράγοντες Thomson οδήγησε κυρίως στην αποτυχία μεθυλίωσης των CpGs. Οι διαφορές στο επίπεδο των μεταγράφων που κωδικοποιούν για τις DNMT3b και TET3 μεταξύ των Y-iPSCs και T-iPSCs μπορεί να συμβάλουν εν μέρει στους διαφορετικούς τύπους των παρεκκλίσεων. Συμπερασματικά, η επιλογή των παραγόντων επαναπρογραμματισμού επηρεάζει την ποσότητα, τη θέση και την κατηγορία των παρεκκλίσεων μεθυλίωσης του DNA στα iPSCs. Τα ευρήματα αυτά μπορεί να παρέχουν ενδείξεις για τον τρόπο παραγωγής ανθρώπινων iPSCs με λιγότερες παρεκκλίσεις μεθυλίωσης του DNA.

## **ABSTRACT**

The conversion of differentiated somatic cells into pluripotent stem cells through the overexpression of reprogramming factors involves their epigenetic remodeling. DNA methylation in induced pluripotent stem cells (iPSCs) differs from that of embryonic stem cells (ESCs) at a significant percentage of CpG sites. Whether different sets of reprogramming factors influence the type and extent of aberrant DNA methylation in iPSCs is an open research subject. In particular, human iPSCs have been generated from fibroblasts using either Yamanaka factors (OCT4, SOX2, KLF4 and cMYC) or Thomson factors (OCT4, SOX2, NANOG and LIN28) and their genome-wide DNA methylation profiles have been determined. In addition to common DNA methylation aberrations present in all iPSCs, recurrent DNA methylation aberrations specific to Yamanaka-iPSCs (Y-iPSCs) and Thomson-iPSCs (T-iPSCs) have been identified. Strikingly, not only the genomic locations of the aberrations were different but also their types. In particular, reprogramming with Yamanaka factors mainly resulted in failure to demethylate CpGs, whereas reprogramming with Thomson factors mainly resulted in failure to methylate CpGs. Differences at the level of transcripts encoding DNMT3b and TET3 between Y-iPSCs and T-iPSCs may contribute partially to the different types of aberrations. In conclusion, the choice of reprogramming factors affects the amount, location, and type of DNA methylation aberrations in iPSCs. These findings may provide evidence on the production of human iPSCs with fewer DNA methylation abnormalities.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

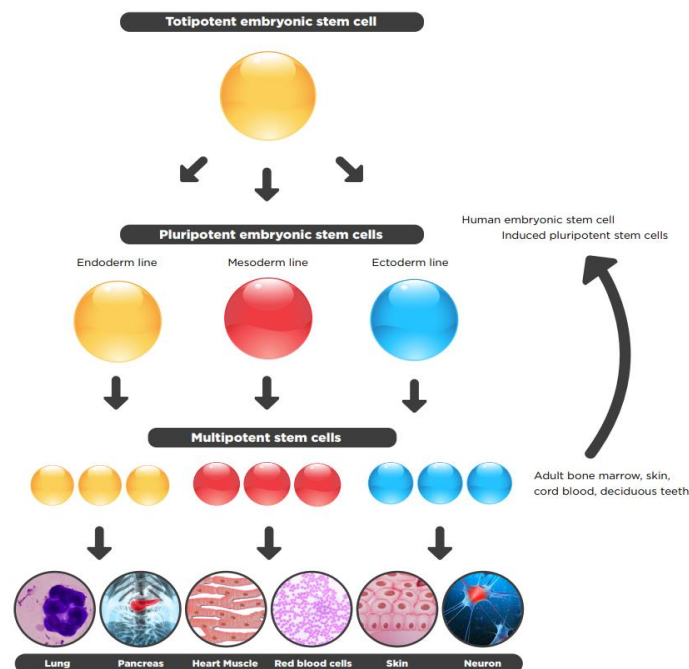
ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	7
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 .....	7
1.1 Το δυναμικό των βλαστικών κυττάρων .....	7
1.2 Τύποι των ανθρώπινων ολοδύναμων βλαστικών κυττάρων (hPSCs).....	9
1.3 Μέθοδος για την παραγωγή των iPSCs .....	9
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 .....	12
2.1 Επιγενετική.....	12
2.2 Μεθυλίωση του DNA.....	13
2.3 Επιγενετικές αλλαγές στα iPSCs.....	14
2.4 Τα προφίλ μεθυλίωσης του DNA σε ολόκληρο το γονιδίωμα αποκαλύπτουν παρεκκλίσεις στα iPSCs.....	16
2.5 Οι παρεκκλίσεις της μεθυλίωσης του DNA που σχετίζονται με το Y-iPSC και το T- iPSC ανήκουν σε διαφορετικές κατηγορίες .....	26
2.6 Ο εντοπισμός των παρεκκλίσεων σε περιοχές δέσμευσης παραγόντων επαναπρογραμματισμού αποτελεί πιθανή αιτία των παρεκκλίσεων μεθυλίωσης του DNA σε Y-iPSCs και T-iPSCs .....	30
2.7 Επίδραση της μακροχρόνιας καλλιέργειας στην παρεκκλίνουσα μεθυλίωση του DNA .....	36
2.8 Σχέση μεταξύ των παρεκκλίσεων μεθυλίωσης του DNA στα iPSCs και των παρεκκλίσεων μεθυλίωσης του DNA στον καρκίνο.....	38
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 .....	40
3.1 Μέθοδος για τον επαναπρογραμματισμό σε καρδιακά μυοκύτταρα (iCMs).....	40
3.2 Επίδραση του συγχρονισμού σε μία φάση του κυτταρικού κύκλου για την πρόοδο του επαναπρογραμματισμού των iCMs .....	43
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	51
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	54

# ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

### 1.1 Το δυναμικό των βλαστικών κυττάρων

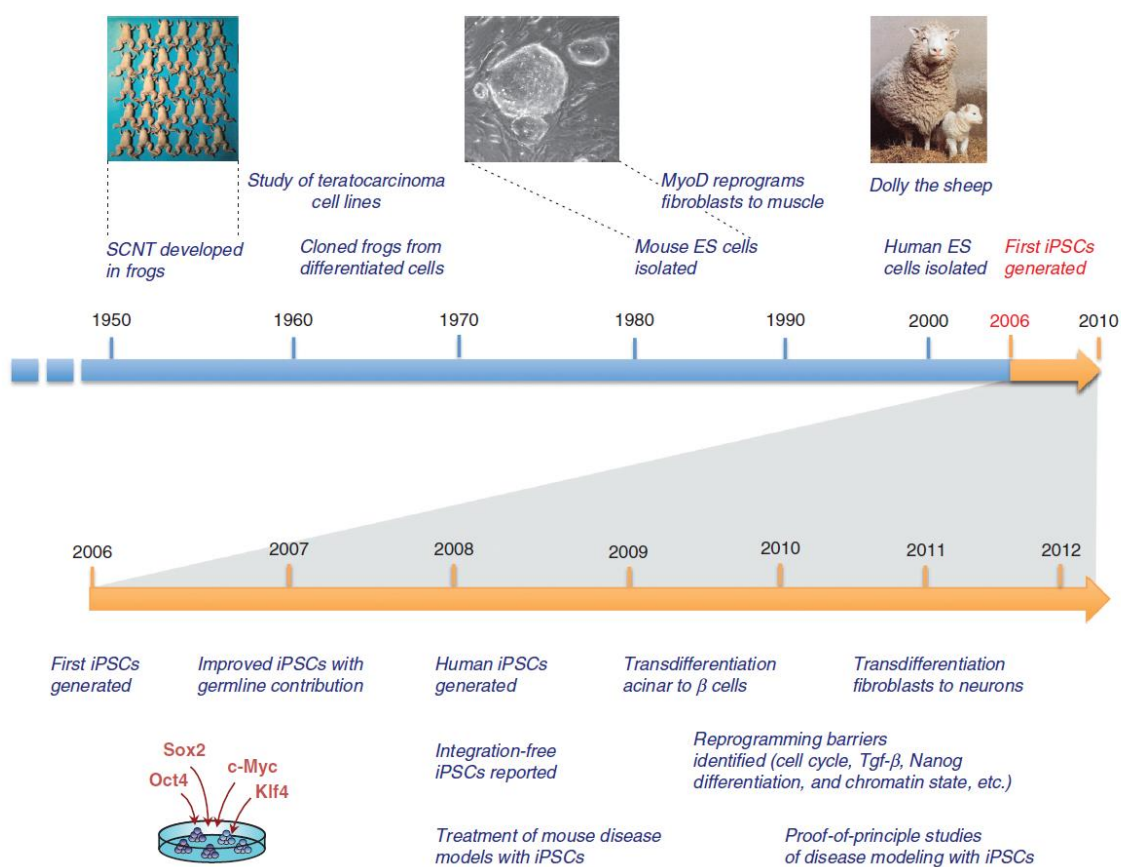
Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, τα κύτταρα ενός πολυκύτταρου οργανισμού διαφοροποιούνται προοδευτικά σε κυτταρικούς τύπους με διαφορετικά λειτουργικά και φαινοτυπικά χαρακτηριστικά. Η εξειδίκευση αυτή των κυττάρων καθορίζεται από την έκφραση ιστοειδικών γονιδίων. Η διαφοροποίηση σε συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο αποτελεί μία σταθερή και μη αντιστρεπτή κατάσταση, η οποία διατηρείται κατά τις κυτταρικές διαιρέσεις των κυττάρων σε όλη τη διάρκεια ζωής του οργανισμού. Η διαδικασία της διαφοροποίησης ξεκινά από το ζυγωτό, όπως φαίνεται στην Εικόνα 1. Όταν το ζυγωτό διαιρείται, οι απόγονοι του μέχρι και την τέταρτη ημέρα από τη γονιμοποίηση αντιπροσωπεύουν τα παντοδύναμα κύτταρα (totipotent embryonic stem cells). Η βλαστοκύστη περιέχει μία συστάδα από κύτταρα που ονομάζεται εσωτερική κυτταρική μάζα (inner cell mass), η οποία αποτελείται από τα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα που είναι ολοδύναμα (pluripotent embryonic stem cells), δηλαδή έχουν τη δυνατότητα διαφοροποίησης σε όλους τους κυτταρικούς τύπους. Οι περισσότεροι ιστοί έχουν πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (multipotent stem cells) που μπορούν να παράγουν περιορισμένες κυτταρικές σειρές (Smith et al. 2016).



Εικόνα 1: Το κυτταρικό δυναμικό

<https://www.technologynetworks.com/cell-science/articles/cell-potency-totipotent-vs-pluripotent-vs-multipotent-stem-cells-303218>

Η ανακάλυψη της επαγόμενης ολοδυναμίας (induced pluripotency), όπως φαίνεται στην Εικόνα 2 είναι αποτέλεσμα έρευνας και τεχνολογίας των τελευταίων έξι δεκαετιών. Αυτές είναι η πυρηνική μεταφορά σωματικού κυττάρου (SCNT) ή κλωνοποίηση, η ανάπτυξη τεχνικών που επέτρεψαν στους ερευνητές να απομονώσουν, να καλλιεργήσουν και να μελετήσουν ολοδύναμες κυτταρικές σειρές και η διαπίστωση ότι οι μεταγραφικοί παράγοντες είναι καθοριστικοί για την πορεία των κυττάρων. Ειδικότερα, η επαγωγή της έκφρασης συγκεκριμένων μεταγραφικών παραγόντων συνέβαλλε στην ανακάλυψη των επαγόμενων ολοδύναμων βλαστικών κυττάρων (induced pluripotent stem cells) (Hochedlinger et al. 2015).



Εικόνα 2: Ιστορική αναδρομή της επιστημονικής έρευνας για τον επαναπρογραμματισμό των κυττάρων (Hochedlinger et al. 2015)

Η χρήση των ανθρώπινων ολοδύναμων βλαστικών κυττάρων (hPSCs) αυξάνεται όλο και περισσότερο παγκοσμίως με σκοπό την ανακάλυψη θεραπειών για ένα ευρύ φάσμα ασθενειών χρησιμοποιώντας τα ως πηγή κυτταρικής θεραπείας. Αρχικά, η πρώτη απομόνωση των ανθρώπινων εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων (hESCs) πραγματοποιήθηκε πριν από 20 χρόνια,



ενώ 6 χρόνια αργότερα κατέστη δυνατός ο πρώτος επιτυχημένος επαναπρογραμματισμός των επαγόμενων ανθρώπινων ολοδύναμων βλαστικών κυττάρων (hiPSCs) (Takahashi et al. 2006).

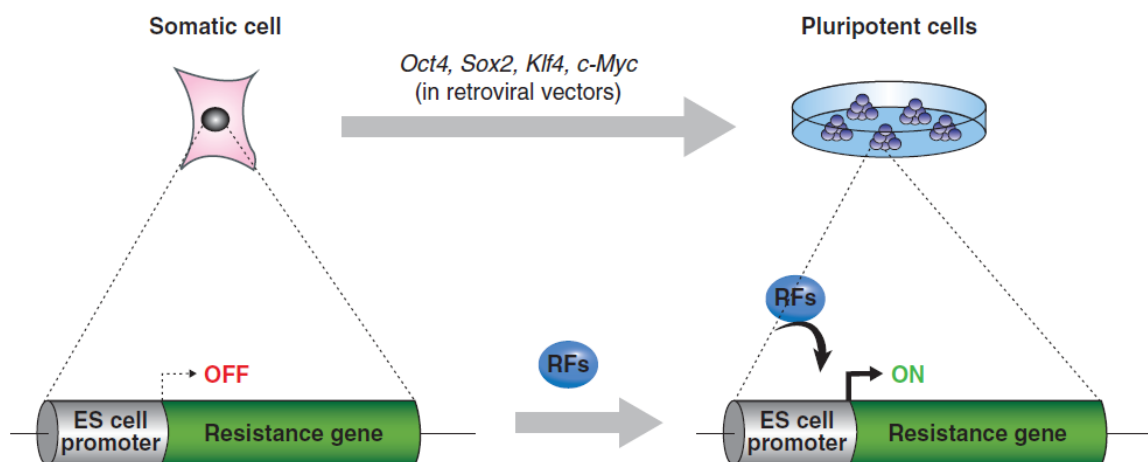
## 1.2 Τύποι των ανθρώπινων ολοδύναμων βλαστικών κυττάρων (hPSCs)

Τα ανθρώπινα ολοδύναμα βλαστικά κύτταρα (hPSCs) μπορούν να ταξινομηθούν σύμφωνα με τη μέθοδο που χρησιμοποιείται για την απομόνωση τους. Τα ανθρώπινα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (hESCs) ήταν τα πρώτα hPSCs που επιτυχώς χρησιμοποιήθηκαν *in vitro*. Η απομόνωση τους έγινε από την εσωτερική κυτταρική μάζα (ICM) *in vitro* γονιμοποιημένων εμβρύων. Ωστόσο, αυτή η απαίτηση για τις ανθρώπινες βλαστοκύστες φέρει ηθικά διλήμματα και περιορίζει την ικανότητα να παραχθούν ανθρώπινες εμβρυϊκές κυτταρικές σειρές (hESCs). Ακολούθησε η παραγωγή ανθρώπινων επαγόμενων ολοδύναμων βλαστικών κυττάρων (hiPSCs) με άμεσο επαναπρογραμματισμό από σωματικά κύτταρα η οποία είναι μια πολλά υποσχόμενη πρόοδος και επέτρεψε την παραγωγή νέων κυτταρικών σειρών (Hochedlinger et al. 2015). Επιπλέον, η παραγωγή των hiPSCs από ασθενείς με διάφορες παθήσεις αποτελεί μια σημαντική πρόοδο προς τις μεταμοσχεύσεις από αυτόλογα διαφοροποιημένα κύτταρα. Επιπρόσθετα, μία άλλη μέθοδος επαναπρογραμματισμού είναι η εισαγωγή πυρήνα σωματικού κυττάρου σε ένα ωκύτταρο με σκοπό την παραγωγή κυττάρων πυρηνικής μεταφοράς PSCs (SCNT-PSCs) (Collier et al. 2018).

## 1.3 Μέθοδος για την παραγωγή των iPSCs

Για τον εντοπισμό μεταγραφικών παραγόντων που να είναι επαρκείς για τον επαναπρογραμματισμό των ενήλικων σωματικών κυττάρων σε ολοδύναμα κύτταρα, οι ερευνητές (Takahashi et al. 2007) εφάρμοσαν μία μέθοδο screen. Ειδικότερα, κατασκεύασαν ένα διαγονίδιο που αποτελείται από το γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα σε ένα φάρμακο επιλογής (resistance gene) και από τον υποκινητή ενός γενετικού τύπου που εκφράζεται στα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (ES cell promoter), όπως φαίνεται στην Εικόνα 3. Έτσι αναζήτησαν μεταγραφικούς παράγοντες που θα μπορούσαν να επάγουν την έκφραση αυτού του διαγονιδίου. Αυτή η στρατηγική επιλέχθηκε για να διασφαλιστεί ο σωστός διαχωρισμός στην κυτταροκαλλιέργεια ανάμεσα στις επαναπρογραμματισμένες και στις μη επαναπρογραμματισμένες αποικίες κυττάρων. Οι ερευνητές επέλεξαν, αρχικά, 24 γονίδια που εκφράζονται ειδικά σε ολοδύναμα κύτταρα ή εμπλέκονται στη βιολογία των κυττάρων ESCs. Ο συνδυασμός όλων των 24 μεταγραφικών παραγόντων, συγκεκριμένα όταν συνεκφράζονται από ρετροϊκούς φορείς σε ινοβλάστες ποντικού, ενεργοποιεί τον γενετικό τύπο Fbxo15 (ES

cell promoter) και προκαλεί το σχηματισμό αποικιών ανθεκτικών στα φάρμακα με χαρακτηριστική μορφολογία των ES κυττάρων, αν και σε εξαιρετικά χαμηλές αποδόσεις (0,01% - 0,1%), (Takahashi et al. 2006) Εικόνα 3.



Εικόνα 3: Στρατηγική για την παραγωγή iPSCs. Σχηματική αναπαράσταση της πρώτης επιτυχημένης προσπάθειας για την παραγωγή iPSCs από τους Takahashi και Yamanaka (Hochedlinger et al. 2015).

Διαδοχικοί κύκλοι κατάργησης μεμονωμένων μεταγραφικών παραγόντων από το κοκτέιλ των γονιδίων οδήγησε στη συνέχεια στον προσδιορισμό του ελάχιστα απαιτούμενου βασικού πυρήνα των τεσσάρων μεταγραφικών παραγόντων, Klf4, Sox2, c-Myc και Oct4. Ο Oct4 (επίσης γνωστός ως POU5F1) είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας (με POU homeodomain) που έχει καθοριστικό ρόλο στην πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη και είναι απαραίτητος για τη διατήρηση της ολοδυναμίας των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων. Ο Sox2 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας της οικογένειας SRY-related HMG-box που συμμετέχει στη ρύθμιση της εμβρυϊκής ανάπτυξης και στον προσδιορισμό της 'μοίρας' του κυττάρου. Ο Sox2 απαιτείται για τη διατήρηση της αυτοανανέωσης των αδιαφοροποίητων εμβρυϊκών και νευρικών βλαστικών κυττάρων. Ο Klf4 είναι μέλος της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων Krüppel-like δακτύλου ψευδαργύρου. Εμπλέκεται στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, στη διαφοροποίηση και στην επιβίωση τους. Επιπρόσθετα, ο Klf4 έχει επικράτεια μεταγραφικής ενεργοποίησης και καταστολής, ενώ ο Myc (επίσης γνωστός ως c-MYC) είναι μεταξύ των πιο συχνά αρνητικά ρυθμιζόμενων ογκογονιδίων στο καρκίνο και ελέγχει την έκφραση εκατοντάδων γονιδίων στόχων, πολλά εκ των οποίων είναι επίσης ογκογονίδια ή ογκοκατασταλτικά, και έχουν ρόλους στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και τον κυτταρικό

κύκλο (González et al. 2011). Τα iPSCs που δημιουργήθηκαν με αυτήν την προσέγγιση εξέφρασαν, επίσης, δείκτες των ολοδύναμων βλαστικών κυττάρων όπως το επιφανειακό αντιγόνο SSEA-1 και Nanog. Ωστόσο, αυτά τα iPSCs είχαν χαμηλότερη έκφραση πολλών άλλων γονιδίων- κλειδιών της ολοδυναμίας και συγκρινόμενα με τα κύτταρα ESCs έδειξαν ελλιπή επαναπρογραμματισμό επιγενετικών σημείων και απέτυχαν να συμβάλλουν στην ανάπτυξη της γαμετικής σειράς. Αυτά τα πρωταρχικά iPSCs, ως εκ τούτου, είναι μερικώς επαναπρογραμματισμένα (Takahashi et al. 2007). Μετά από αυτήν τη μελέτη, οι Yamanaka και συνεργάτες ήταν σε θέση να αναπαράγουν και να βελτιώσουν τα ανωτέρω ευρήματα. Συγκεκριμένα, επιλέγοντας για την επανενεργοποίηση των βασικών γονιδίων της ολοδυναμίας τους υποκινητές των γονιδίων Nanog ή Oct4 αντί του Fbxo15 (ES cell promoter), όπως φαίνεται στην Εικόνα 4, δημιουργήθηκαν iPSCs που μοριακά και λειτουργικά μοιάζουν περισσότερο με τα ES κύτταρα (Okita et al. 2007) (Wernig et al. 2007). Ειδικότερα, ο μερικός επαναπρογραμματισμός σε iPSCs επιτεύχθηκε με μόλυνση με ιούς των κυττάρων με τους μεταγραφικούς παράγοντες Oct4, Sox2, Klf4 και c-Myc, ακολουθούμενη από επιλογή μέσω φαρμάκου για κύτταρα που εκφράζουν το γονίδιο Fbxo15. Σε αντίθεση, ακόλουθες τροποποιήσεις στη μελέτη για την επιλογή κυττάρων που εκφράζουν Oct4 ή Nanog προκάλεσαν την παραγωγή πλήρως επαναπρογραμματισμένων iPSCs. Να σημειωθεί ότι η επιλογή μέσω φαρμάκου δεν είναι απαραίτητη για την παραγωγή υψηλής ποιότητας iPSCs, αλλά χρησιμοποιήθηκε ως μέρος της ανάλυσης για τον προσδιορισμό παραγόντων που επάγουν την έκφραση εμβρυϊκών γονιδίων. Πιο πρόσφατα, δημιουργήθηκαν iPSCs ικανά να παράγουν εξ' ολοκλήρου ποντίκια μετά την έγχυση σε τετραπλοειδείς βλαστοκύστες (Zhao et al. 2009) (Boland et al. 2009) υποδηλώνοντας έτσι ότι τουλάχιστον ορισμένοι κλώνοι iPSCs έχουν αναπτυξιακή ισχύ ισοδύναμη με εκείνη των κυττάρων ES.

Test promoter:	Resistance gene:	Assay result:
Fbxo15	Neomycin	Partially reprogrammed iPSC
Oct4	Neomycin	Fully reprogrammed iPSC
Nanog	Puromycin	Fully reprogrammed iPSC

Εικόνα 4: Το γενετικό σύστημα ανάλυσης που χρησιμοποιείται για τον έλεγχο παραγόντων που θα μπορούσαν να επαναπρογραμματίσουν με σκοπό τη δημιουργία ολοδύναμων βλαστοκυττάρων

Επιπρόσθετα, μπορούν να προκύψουν υψηλής ποιότητας iPSCs ποντικίου από γενετικά μη τροποποιημένα σωματικά κύτταρα χωρίς την επιλογή μέσω ανθεκτικότητας σε φάρμακο χρησιμοποιώντας μόνο μορφολογικά κριτήρια (Blelloch et al. 2007) (Meissner et al. 2007). Αυτή η ανακάλυψη ήταν κρίσιμη για την επέκταση της επαγόμενης ολοδυναμίας σε άλλα είδη για τα οποία τα διαγονιδιακά εργαλεία δεν ήταν εύκολα διαθέσιμα. Για παράδειγμα, έχουν παραχθεί iPSCs με επιτυχία από τον άνθρωπο (Takahashi et al. 2007) (Park et al. 2008), από τον αρουραίο (W. Li et al. 2009) και από ινοβλάστες πιθήκου rhesus (Liu et al. 2008) με την επαγωγή της έκφρασης των ίδιων τεσσάρων μεταγραφικών παραγόντων Yamanaka, αποδεικνύοντας ότι τα βασικά χαρακτηριστικά του μεταγραφικού δικτύου που διέπει την ολοδυναμία διατηρείται κατά τη διάρκεια της εξέλιξης. Επιπλέον, iPSCs κύτταρα έχουν προέλθει και από άλλους πληθυσμούς σωματικών κυττάρων όπως κερατινοκύτταρα (Aasen et al. 2008), νευρικά κύτταρα (Eminli et al. 2008), κύτταρα στομάχου και ήπατος (Aoi et al. 2008), παγκρεατικά β κύτταρα (Stadtfield et al. 2008), μελανοκύτταρα (Utikal et al. 2009), και διαφοροποιημένα B και T λεμφοκύτταρα (Eminli et al. 2009), αναδεικνύοντας έτσι τη γενικότητα της επαγόμενης ολοδυναμίας ανάμεσα στους διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

### 2.1 Επιγενετική

Η επιγενετική τροποποίηση σε ολόκληρο το γονιδίωμα αποτελεί ένα κρίσιμο γεγονός στη δημιουργία των iPSCs. Περίπου 200 είδη ανθρώπινων κυττάρων έχουν συγκεκριμένα πρότυπα γονιδιακής έκφρασης που είναι χαρακτηριστικά της κυτταρικής τους ταυτότητας. Διάφορα κύτταρα έχουν ένα μοναδικό επιγενετικό προφίλ, το οποίο καθορίζει την ειδική για κάθε κυτταρικό τύπο γονιδιακή έκφραση. Η επιγενετική είναι ένας μηχανισμός που επιτρέπει τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης μέσω της μεθυλίωσης του DNA και της τροποποίησης της ιστόνης, χωρίς να παρεμβάλλεται αλλαγή των αλληλουχιών του γονιδιωματικού DNA. Ολόκληρο το επιγενετικό προφίλ σε ένα μεμονωμένο κύτταρο αναφέρεται ως το επιγένωμα του. Τα γονιμοποιημένα ωάρια υφίστανται συνεχή κυτταρικό πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση των κυττάρων που προκύπτουν. Οι διαδικασίες αυτές συνοδεύονται από δυναμικές αλλαγές στο επιγένωμα, ακολουθούμενες από την καθιέρωση του ειδικού για κάθε κυτταρικό τύπο επιγενώματος (Shiota et al. 2002) (E. Li 2002) (Reik 2007).

## 2.2 Μεθυλίωση του DNA

Η πιο ευρεία μελετημένη επιγενετική τροποποίηση είναι η μεθυλίωση του DNA, στην οποία μεθυλομάδες προστίθενται στον πέμπτο άνθρακα των καταλοίπων της κυτοσίνης, σχηματίζοντας έτσι 5-μεθυλοκυτοσίνη (5-mC), κυρίως στο περιβάλλον των δινουκλεοτιδίων CpG. Η μεθυλίωση του DNA στη θέση (5mC) είναι ένα σταθερό επιγενετικό σημάδι που έχει σημαντικούς ρόλους στην ανάπτυξη των θηλαστικών, στη διαφοροποίηση και στη διατήρηση της κυτταρικής ταυτότητας μέσω του ελέγχου της γονιδιακής έκφρασης (Smith et al. 2013). Η μεθυλίωση του DNA στα σπονδυλωτά περιορίζεται κυρίως στις νησίδες CpG (CpG islands), αλλά έχει βρεθεί σημαντική μεθυλίωση σε περιοχές χωρίς CpG νησίδες στο γονιδίωμα στα ολοδύναμα βλαστικά κύτταρα (Ziller et al. 2011). Υπάρχουν ~ 29 εκατομμύρια CpGs στο ανθρώπινο γονιδίωμα και 60-80% εξ αυτών είναι μεθυλιωμένες (Lister et al. 2009). Περίπου το 7% των CpGs βρίσκονται στις νησίδες CpG (CGIs), που είναι περιοχές υψηλής πυκνότητας σε CG. Περίπου το 70% των υποκινητών των γονιδίων σχετίζονται με μία νησίδα CGI και οι νησίδες CGIs είναι σε μεγάλο βαθμό ανθεκτικές στη μεθυλίωση του DNA. Τα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για τη μεθυλίωση του DNA είναι οι DNA μεθυλο-τρανσφεράσες (DNMTs) συμπεριλαμβανομένων των DNMT1, DNMT3A, DNMT3B και DNMT3C (Okano et al. 1999) (Barau et al. 2016).

Τα μοτίβα μεθυλίωσης του DNA μεταδίδονται με μεγάλη πιστότητα κατά τη διάρκεια της αντιγραφής του DNA. Η μεθυλο-τρανσφεράση DNMT1 διατηρεί την καθολική (global) μεθυλίωση του DNA και δείχνει μια ισχυρή προτίμηση για ημιμεθυλιωμένο DNA. Η DNMT1 επιστρατεύεται στη διχάλα της αντιγραφής του DNA μέσω άμεσων αλληλεπιδράσεων με το PCNA (proliferating cell nuclear antigen) και το UHRF1 (ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains 1, επίσης γνωστό ως Np95 and ICBP90) (Bostick et al. 2007). Το UHRF1 αναγνωρίζει ημιμεθυλιωμένες περιοχές μέσω μιας περιοχής SRA και στρατολογεί τη DNMT1 σε αυτές τις περιοχές. Τα ένζυμα που επηρεάζουν τη δομή της χρωματίνης (chromatin associated enzymes) ρυθμίζουν, επίσης, τη DNMT1 μέσω μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων (Smith et al. 2013). Η LSD1 (ειδική για λυσίνη απομεθυλάση 1, επίσης γνωστή ως KDM1) είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της καθολικής (global) μεθυλίωσης του DNA. Συγκεκριμένα, ρυθμίζει την κατάσταση μεθυλίωσης της DNMT1 διατηρώντας τη σταθερότητα της. Η μεθυλίωση της λυσίνης 9 της ιστόνης H3 (H3K9me) είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της μεθυλίωσης του DNA καθώς συνδέεται στο UHRF1 και ρυθμίζει τη σταθερότητα της DNMT1 κατά τη φάση S (Rothbart et al. 2012). Αυτές οι αλληλεπιδράσεις της DNMT1 με άλλες πρωτεΐνες (heterochromatin associated proteins) διασφαλίζουν ότι η

δραστηριότητα της DNMT1 σταθεροποιείται μόνο κατά την αντιγραφή του DNA παρέχοντας πιστότητα στην ευρεία μεθυλίωση του DNA (Smith et al. 2013).

Παρόλο που η μεθυλίωση του DNA σχετίζεται κυρίως με την καταστολή της γονιδιακής έκφρασης, η ρυθμιστική της λειτουργία αναδύεται ως πιο περίπλοκη και εξαρτάται από την πυκνότητα CpG. Έτσι, σε πολλές περιπτώσεις, η τροποποίηση 5-mC είναι δευτερεύουσα σε σχέση με άλλα κατασταλτικά σήματα και συμβάλλει στη διατήρηση ετεροχρωματικής μνήμης και στη μακροχρόνια αποσιώπηση γονιδίων. Κατά συνέπεια, η απουσία της μεθυλίωσης σε έναν υποκινητή δεν προκαλεί απαραίτητα την ενεργοποίηση της έκφρασης του συγκεκριμένου γονιδίου, καθώς απαιτούνται επιπλέον παράγοντες για την επαγωγή της έκφρασής του (Hackett et al. 2013). Ωστόσο, η λειτουργία της 5-mC είναι κρίσιμη για τη σίγαση των τρανσποζονίων και επίσης συμβάλλει στη διακοπή της αλληλουχίας του DNA με την πάροδο του χρόνου ευνοώντας μεταλλάξεις μέσω της απαμίνωσης.

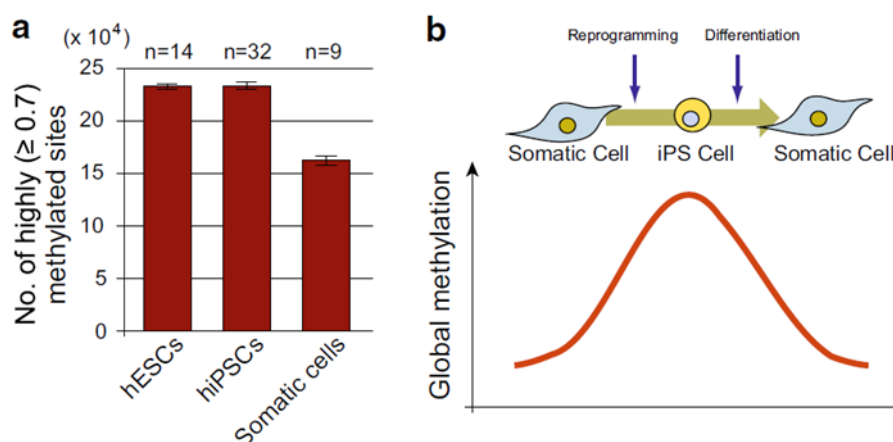
### 2.3 Επιγενετικές αλλαγές στα iPSCs

Τα iPSCs μπορούν να παραχθούν με την εισαγωγή μεταγραφικών παραγόντων επαναπρογραμματισμού, όπως είναι οι OCT-3/4, SOX2, KLF4 και c-MYC, σε διαφοροποιημένα σωματικά κύτταρα. Η έκφραση των διαγονιδίων αποσιωπάται και αντικαθίσταται από την έκφραση ενδογενών γονιδίων, υποδεικνύοντας ότι το επιγενετικό πρότυπο έχει μετατραπεί σε αυτό των ολοδύναμων βλαστικών κυττάρων. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, τα κύτταρα αποκτούν τις ιδιότητες της αθανασίας και της ολοδυναμίας, ιδιότητες και των ESCs. Επομένως, η επιγενετική ανάλυση είναι σημαντική για την κατανόηση των iPSCs.

Παρά το γεγονός πως εμφανίζουν ολοδυναμία, έχει αναφερθεί ότι τα iPSCs έχουν διαφορετικές τάσεις για διαφοροποίηση (Miura et al. 2009). Αυτές οι παραλλαγές θεωρούνται ότι προκύπτουν από μη φυσιολογικές καταστάσεις μεθυλίωσης του DNA που εμφανίστηκαν κατά τον επαναπρογραμματισμό. Επίσης, μπορεί να προκύπτουν από την κληρονόμηση προφίλ μεθυλίωσης του DNA ως επιγενετική μνήμη από τα γονικά τους κύτταρα (Polo et al. 2010). Για να αντιμετωπίσουν αυτό το ζήτημα, οι ερευνητές δημιούργησαν πάνω από 200 κυτταρικές σειρές ανθρώπινων iPSCs που προέρχονται από διαφορετικούς ανθρώπινους ιστούς και μελέτησαν τα προφίλ μεθυλίωσης του DNA τους.

Η ανάλυση αποκάλυψε ότι οι μηχανισμοί επαναπρογραμματισμού διέπονται από πολύπλοκες κινητικές. Θεωρούνταν ότι, σε σύγκριση με διαφοροποιημένα σωματικά κύτταρα, τα ολοδύναμα βλαστικά κύτταρα έχουν χαμηλή κατάσταση μεθυλίωσης σε ολόκληρο το

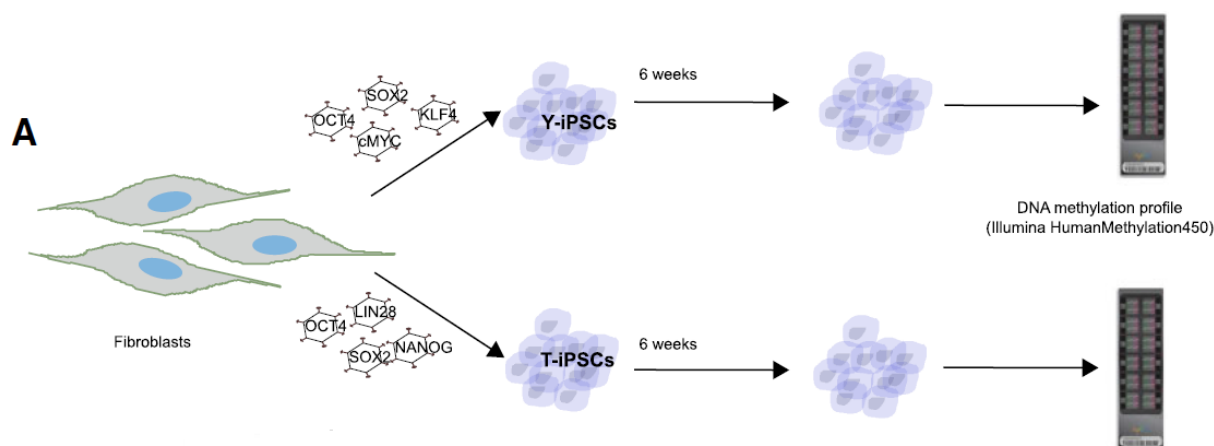
γονιδίωμα για διάφορα γονίδια έτοιμα να εκφραστούν. Επίσης, πίστευαν ότι, μόλις ξεκινήσει η διαφοροποίηση τα βλαστοκύτταρα αποκτούν πρότυπο μεθυλίωσης για τον περιορισμό της έκφρασης ορισμένων συνόλων γονιδίων, χάνοντας έτσι την ολοδυναμία. Ωστόσο, με βάση τα σύγχρονα αποτελέσματα των ερευνητών, ο βαθμός της μεθυλίωσης σε επίπεδο ολόκληρου γονιδιώματος στα hESCs και hiPSCs είναι υψηλότερος από αυτόν σε σωματικά κύτταρα. Προηγούμενες μελέτες έχουν, επίσης, αναφέρει τα αποτελέσματα που υποστηρίζουν οι ερευνητές (Doi et al. 2009) (Deng et al. 2009). Όταν τα hiPSCs αφέθηκαν να διαφοροποιηθούν σε σωματικά κύτταρα, ο αριθμός των υπερμεθυλιωμένων γονιδίων μειώθηκε, όπως φαίνεται στην Εικόνα 5. Ειδικότερα, στην Εικόνα 5a απεικονίζεται ο μέσος αριθμός των πολύ (> 0.7) μεθυλιωμένων CpG θέσεων στα διάφορα είδη κυττάρων. Ο αριθμός των πολύ μεθυλιωμένων θέσεων σε hESCs και hiPSCs είναι υψηλότερος από αυτόν σε σωματικά κύτταρα. Η αναλογία της μεθυλίωσης αντιπροσωπεύει μια ποσοτική βαθμολογία των επιπέδων μεθυλίωσης του DNA, που κυμαίνεται από 0, για εντελώς μη μεθυλιωμένο, έως 1, για πλήρως μεθυλιωμένο. Το n αντιπροσωπεύει τον αριθμό των κυτταρικών σειρών. Στην εικόνα 5b απεικονίζεται η κινητική του αριθμού των πολύ μεθυλιωμένων θέσεων κατά τον επαναπρογραμματισμό και την επαναδιαφοροποίηση. Τέτοια ευρήματα δείχνουν ότι τα ανθρώπινα ολοδύναμα βλαστικά κύτταρα χρησιμοποιούν τη μεθυλίωση του DNA για να καταστέλλουν τα γονίδια που σχετίζονται με τη διαφοροποίηση. Μετά τη διαφοροποίηση, απομακρύνεται η μεθυλίωση του DNA, επιτρέποντας στα απαραίτητα γονίδια να είναι έτοιμα για να εκφραστούν. Από την άλλη πλευρά, τα ESCs ποντικού, εμφανίζουν ευρεία υπομεθυλίωση που αντιστοιχεί σε πρόιμα εμβρυϊκά κύτταρα (Leitch et al. 2013).



Εικόνα 5: Η υπερμεθυλίωση των ανθρώπινων ολοδύναμων βλαστικών κυττάρων σε σύγκριση με τα σωματικά κύτταρα

## 2.4 Τα προφίλ μεθυλίωσης του DNA σε ολόκληρο το γονιδίωμα αποκαλύπτουν παρεκκλίσεις στα iPSCs

Η έκτοπη έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων που εκφράζονται στα κύτταρα ESCs μπορεί να επαναπρογραμματίσει τα σωματικά κύτταρα σε ολοδύναμα βλαστικά κύτταρα (Yamanaka 2009). Τα iPSCs προήλθαν από ινοβλάστες ανθρώπινης νεογνικής ακροποσθίας μέσω ρετροϊκής λοίμωξης παραγόντων επαναπρογραμματισμού (Takahashi et al. 2007). Μια κοινή ομάδα ινοβλαστών ανθρώπινης νεογνικής ακροποσθίας χωρίστηκε σε 3 υποομάδες, όπως φαίνεται στην Εικόνα 6Α. Η πρώτη επεξεργάστηκε απευθείας για ανάλυση της μεθυλίωσης του DNA. Η δεύτερη μολύνθηκε με ρετροϊούς που κωδικοποιούν τους παράγοντες Yamanaka, δηλαδή τους παράγοντες επαναπρογραμματισμού OCT4, SOX2, KLF4 και cMYC. Η τρίτη μολύνθηκε με ρετροϊούς που κωδικοποιούν τους παράγοντες Thomson, δηλαδή τους παράγοντες επαναπρογραμματισμού OCT4, SOX2, NANOG και LIN28. Οι ερευνητές επέλεξαν 9 Y-iPSCs και 6 T-iPSCs που είχαν χαρακτηριστική μορφολογία τύπου ESC, εκφράζουν πολλά γονίδια ολοδυναμίας και μπορούν να διατηρηθούν σταθερά στην κυτταρική καλλιέργεια.



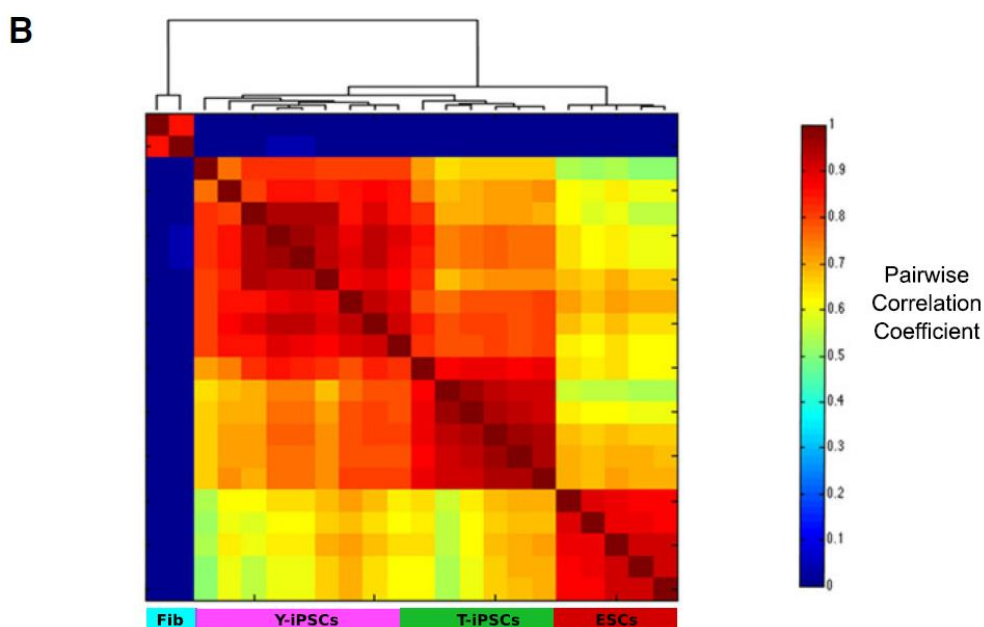
Εικόνα 6Α: Σχέδιο που δείχνει τον πειραματικό σχεδιασμό. Οι ερευνητές μεταχειρίστηκαν τα Y-iPSCs και τα T-iPSCs κύτταρα με τον ίδιο τρόπο και 25 ημέρες μετά τη μόλυνση, οι αποικίες συλλέχθηκαν τυχαία και διατηρήθηκαν σε καλλιέργεια για 6 εβδομάδες. Μελετήθηκε το πρότυπο μεθυλίωσης του DNA κατά τη διάρκεια των πρώιμων περασμάτων των iPSCs (Hussein et al. 2011).

Το γονιδιωματικό DNA από καθένα από τα iPSCs υποβλήθηκε σε μελέτη του προφίλ μεθυλίωσης του DNA χρησιμοποιώντας την πλατφόρμα Illumina HumanMethylation 450. Οι επιστήμονες αξιολόγησαν το σύνολο των δεδομένων τους με δημοσιευμένα δεδομένα μεθυλίωσης για διάφορα αρσενικά ESCs (SIVF002, SIVF025, SIVF043, SIVF044, SIVF050)



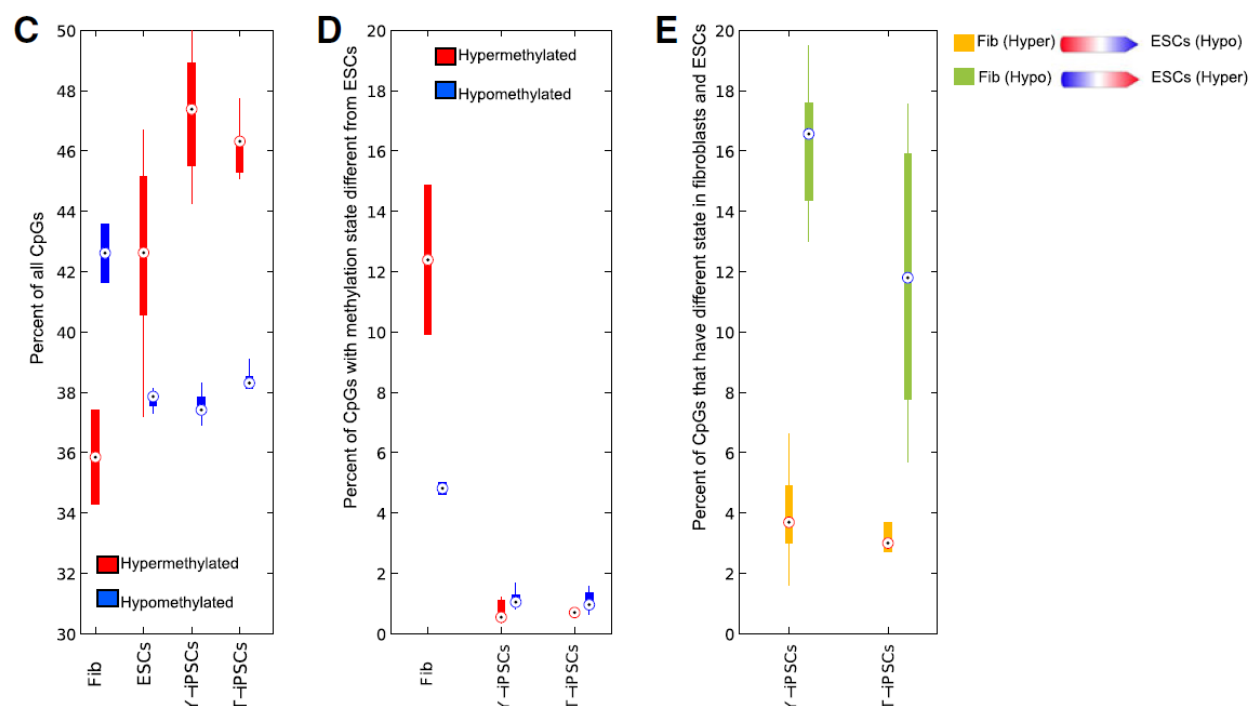
(Nazor et al. 2012). Για να επικυρώσουν τα δεδομένα της μεθυλίωσης του DNA που ελήφθησαν από την πλατφόρμα Illumina HumanMethylation450, οι ερευνητές πραγματοποίησαν αλληλούχηση υψηλής απόδοσης σύμφωνα με την αξιολόγηση της μεθυλίωσης DNA που ονομάζεται αλληλούχηση διθειώδους μειωμένης αναπαράστασης (RRBS) σε ένα από τα Y-iPSCs και σε ένα από τα T-iPSCs. Τα συνολικά δεδομένα της μεθυλίωσης από την Illumina HumanMethylation450 και την RRBS ήταν σύμφωνα (με μέσο συντελεστή συσχέτισης 0,8). Αυτά τα αποτελέσματα ήταν παρόμοια με τη συσχέτιση Pearson μεταξύ των RRBS και των συστοιχιών μεθυλίωσης DNA της Illumina που αποκτήθηκαν σε διαφορετική μελέτη χρησιμοποιώντας τα ίδια σημεία cutoffs (Bock et al. 2010) και υποστηρίζουν την αξιοπιστία των δεδομένων που ελήφθησαν στη μελέτη των ερευνητών.

Για τον προσδιορισμό της αντιστοιχίας των τιμών μεθυλίωσης μεταξύ των γονεϊκών δειγμάτων ινοβλαστών, iPSC και ESC, οι ερευνητές πραγματοποίησαν ομαδοποίηση με τον υπολογισμένο συντελεστή συσχέτισης κατά ζεύγη όλων των τιμών μεθυλίωσης DNA και ταυτοποιήθηκαν 3 ομάδες μεθυλίωσης DNA, όπως φαίνεται στην Εικόνα 6B. Το σύμπλεγμα 1 σχημάτισε ένα ιδιαίτερα συμπαγές σύμπλεγμα που διαχωρίστηκε καλά από τα άλλα 2 συμπλέγματα και συγκροτήθηκε από τους γονεϊκούς ινοβλάστες. Τα iPSCs και ESCs συγκρότησαν τις συστάδες 2 και 3, αντίστοιχα.



Εικόνα 6B: Το προφίλ μεθυλίωσης των iPSCs είναι παρόμοιο με το προφίλ μεθυλίωσης των ESCs και διαφέρει σημαντικά από το προφίλ μεθυλίωσης των ινοβλαστών. Οι τιμές έντασης μετατράπηκαν σε τιμές, όπου η τιμή 0 αντιπροσωπεύει μη μεθυλιωμένη περιοχή και η τιμή 1 αντιπροσωπεύει πλήρως μεθυλιωμένη περιοχή.

Αυτό δείχνει ότι, όπως αναμενόταν, τα προφίλ μεθυλίωσης του DNA των iPSCs ήταν διαφορετικά από τους γονεικούς ινοβλάστες και ήταν πλησιέστερα, αλλά διαχωρισμένα από, τα προφίλ μεθυλίωσης των ESCs. Οι ινοβλάστες είχαν πολύ υψηλότερο ποσοστό χαμηλά μεθυλιωμένων CpGs σε σχέση με τα υψηλά μεθυλιωμένα CpGs. Αυτή η τάση ήταν αντίθετη στα ESCs και στα iPSCs, όπως φαίνεται στην Εικόνα 6C. Οι επιστήμονες υπολόγισαν το ποσοστό των CpGs σε ινοβλάστες και iPSCs που διαφέρουν σημαντικά στην κατάσταση μεθυλίωσης από εκείνα των ESCs. Οι ινοβλάστες είχαν περίπου το 17% των CpGs που έχουν σημαντικά διαφορετικά επίπεδα μεθυλίωσης σε σχέση με τα ESCs, ενώ τα iPSCs είχαν λιγότερο από 2% των CpGs που διαφέρουν από τα ESCs, όπως φαίνεται στην Εικόνα 6D. Είναι ενδιαφέρον ότι, σε ινοβλάστες, οι υπερμεθυλιωμένες θέσεις CpGs είχαν περισσότερες πιθανότητες να έχουν διαφορετική κατάσταση μεθυλίωσης σε σύγκριση με τα ESCs από ότι υπομεθυλιωμένες καταστάσεις, ενώ οι θέσεις CpGs στα iPSCs με τιμές μεθυλίωσης διαφορετικές από τα ESCs είναι εξίσου πιθανές να είναι υπερμεθυλιωμένες ή υπομεθυλιωμένες, όπως φαίνεται στην Εικόνα 6D. Τελικά, οι θέσεις CpGs με τιμές μεθυλίωσης σημαντικά διαφορετικές μεταξύ των iPSCs και ESCs εμπλουτίζονται για εκείνες που υπομεθυλιώνονται σε ινοβλάστες σε σύγκριση με τα ESCs. Ειδικότερα, αυτό σημαίνει ότι αποτυγχάνουν να μεθυλιωθούν σωστά στα κύτταρα iPSCs, όπως φαίνεται στην Εικόνα 6E. Αυτό το αποτέλεσμα είναι σύμφωνο με προηγούμενα ευρήματα (Bilic et al. 2012).



**Εικόνα 6C:** Το boxplot των ποσοστών με υψηλά μεθυλιωμένα (κόκκινο) και χαμηλά μεθυλιωμένα (μπλε) CpGs σε ινοβλάστες, ESCs, Y-iPSCs και T-iPSCs δείχνει ότι τα συνολικά επίπεδα τους στα

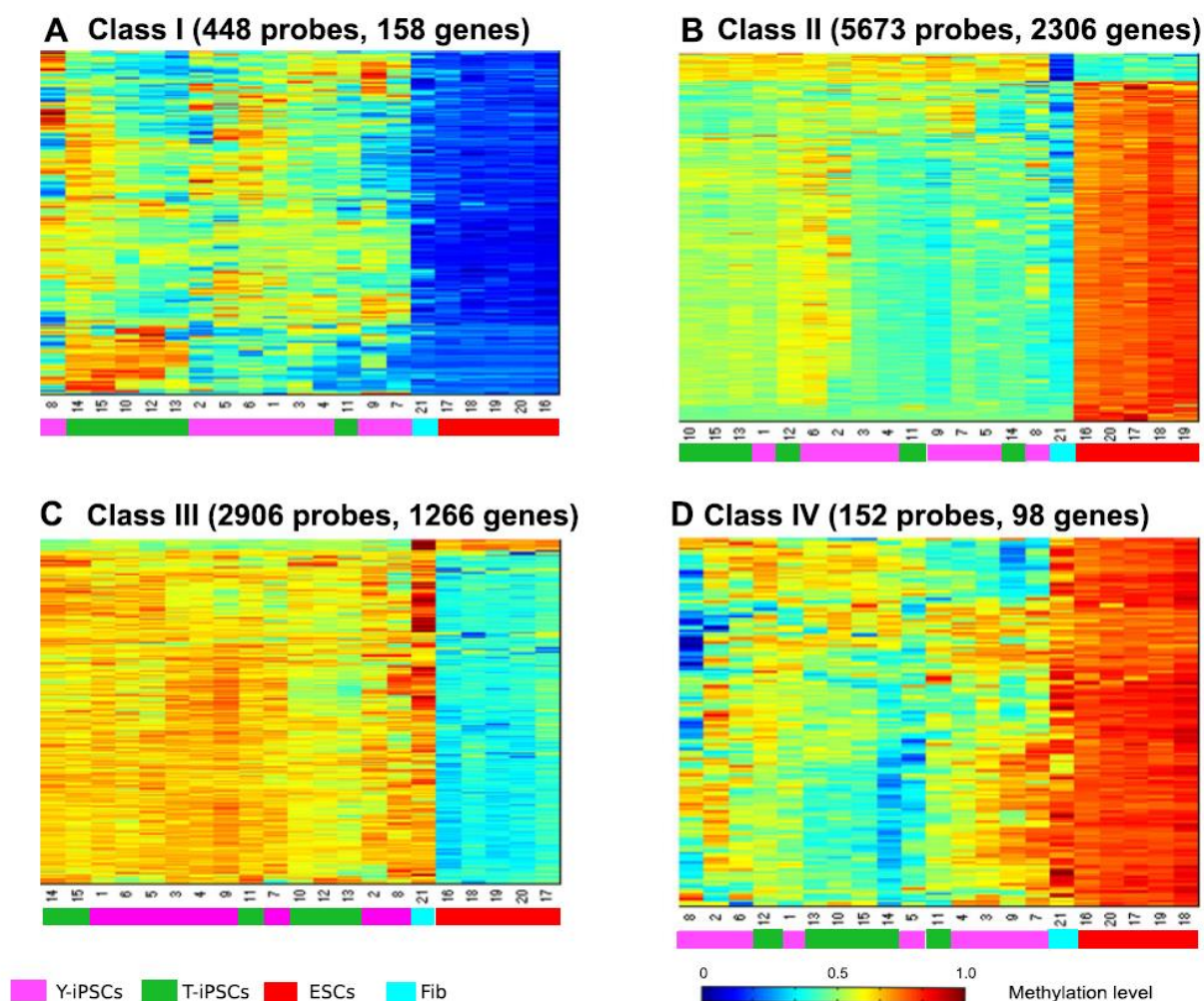
iPSCs είναι σε μεγάλο βαθμό παρόμοια με αυτά των ESCs. Τα υπερμεθυλιωμένα CpGs ορίζονται ως εκείνα με τιμές  $> 0,7$  και τα υπομεθυλιωμένα CpGs ορίζονται ως εκείνα με τιμές  $< 0,3$ . Το Hyper και το Hypo αντιπροσωπεύουν υπερμεθυλιωμένα και υπομεθυλιωμένα, αντίστοιχα. 6D) Το boxplot των ποσοστών με υψηλά μεθυλιωμένα (κόκκινο) και χαμηλά μεθυλιωμένα (μπλε) CpGs σε ινοβλάστες, Y-iPSCs και T-iPSCs που διαφέρουν σημαντικά από τα ESCs (ορίζονται ως εκείνα με διαφορά στη μεθυλίωση  $\geq 0,2$ ) δείχνει ότι μόνο ένα μικρό ποσοστό των CpGs στα iPSCs είναι διαφορετικό από εκείνο των ESCs. 6E) Το boxplot κατασκευάστηκε όπως στην Εικόνα 6D αλλά περιορίζεται μόνο σε εκείνα τα CpGs που αλλάζουν την κατάσταση μεθυλίωσης από ινοβλάστες σε ESCs. Τα CpGs που είναι υπομεθυλιωμένα σε ινοβλάστες αλλά υπερμεθυλιωμένα σε ESCs (πράσινο) είναι πιο πιθανό να διαφέρουν σημαντικά στα iPSCs από τα CpGs που υπερμεθυλιώνονται σε ινοβλάστες και υπομεθυλιώνονται σε ESCs (κίτρινο).

Οι ερευνητές για να προσδιορίσουν τα CpGs που μεθυλιώνονται διαφορετικά μεταξύ των iPSCs και ESCs, χρησιμοποίησαν μια διαφορά μεθυλίωσης DNA μεγαλύτερη από 0,2 ή μικρότερη από -0,2 και ένα False Discovery Rate (FDR)- διορθωμένο p-value χαμηλότερο από 0,05 ως κατώφλι.

Οι παρεκκλίσεις της μεθυλίωσης του DNA που μοιράστηκαν τα iPSCs χωρίστηκαν σε 4 κατηγορίες: Η κατηγορία I αντιπροσωπεύει τη de novo μεθυλίωση (ορίζεται ως μεθυλιωμένες περιοχές σε iPSCs που δεν μεθυλιώνονται στα κύτταρα ESCs και στα γονεϊκά κύτταρα), η κατηγορία II αντιπροσωπεύει την αποτυχημένη μεθυλίωση (ορίζεται ως μη μεθυλιωμένες περιοχές σε iPSCs που είναι μη μεθυλιωμένες σε γονεϊκά κύτταρα αλλά μεθυλιωμένες σε ESCs), η κατηγορία III αντιπροσωπεύει την αποτυχημένη απομεθυλίωση (ορίζεται ως μεθυλιωμένες περιοχές σε iPSCs που μεθυλιώνονται σε γονεϊκά κύτταρα αλλά δε μεθυλιώνονται σε ESCs) και η κατηγορία IV αντιπροσωπεύει τη de novo απομεθυλίωση (ορίζεται ως μη μεθυλιωμένες θέσεις σε iPSCs που μεθυλιώνονται τόσο στα γονεϊκά κύτταρα όσο και στα ESCs).

Σύμφωνα με τα προηγούμενα ευρήματα, όλα τα iPSCs είχαν παρεκκλίσεις της μεθυλίωσης του DNA, όπως φαίνεται στην Εικόνα 7. Περίπου το 62% των παρεκκλίσεων ανήκαν στην Κατηγορία II (αποτυχημένη μεθυλίωση), όπως φαίνεται στην Εικόνα 7B και περίπου το 32% των παρεκκλίσεων ανήκαν στην Κατηγορία III (αποτυχημένη απομεθυλίωση), όπως φαίνεται στην Εικόνα 7D. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η ανεπαρκής αλλαγή της γονιικής κατάστασης μεθυλίωσης του DNA (αναφέρεται επίσης ως επιγενετική μνήμη του ιστού προέλευσης), αντί για τις de novo αλλαγές στη μεθυλίωση του DNA, είναι ο τύπος

παρεκκλίσεων που μοιράζονται όλα τα iPSCs ανεξάρτητα από το εάν οι παράγοντες επαναπρογραμματισμού που είχαν χρησιμοποιηθεί ήταν οι παράγοντες Yamanaka ή οι παράγοντες Thomson.



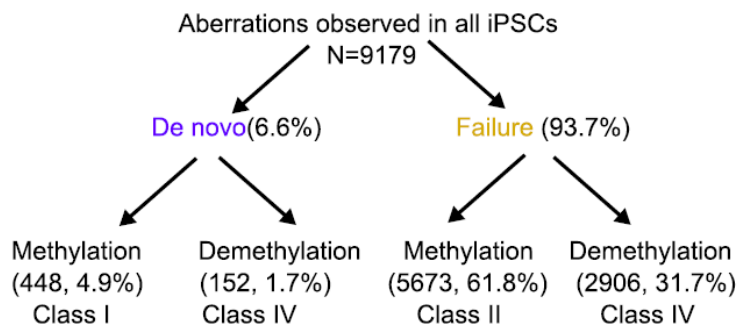
Εικόνα 7: Οι παρεκκλίσεις της μεθυλίωσης του DNA που είναι συχνές σε Y- και T-iPSCs. A) Υπομεθυλιωμένα CpGs σε ινοβλάστες που υφίστανται de novo μεθυλίωση. B) Υπομεθυλιωμένα CpGs που αποτυγχάνουν να μεθυλιωθούν. C) Υπερμεθυλιωμένα CpGs σε ινοβλάστες που δεν απομεθυλιώνονται. D) Υπερμεθυλιωμένα CpGs σε ινοβλάστες που υφίστανται παρεκκλίνουσα μεθυλίωση.

**E** U=Unmethylated M=Methylated

Fibroblasts	U	U	M	M
ESCs	U	M	U	M
iPSCs	U	M	U	M
Aberrations	M	U	M	U

De novo methylation Failure to methylate Failure to demethylate De novo demethylation

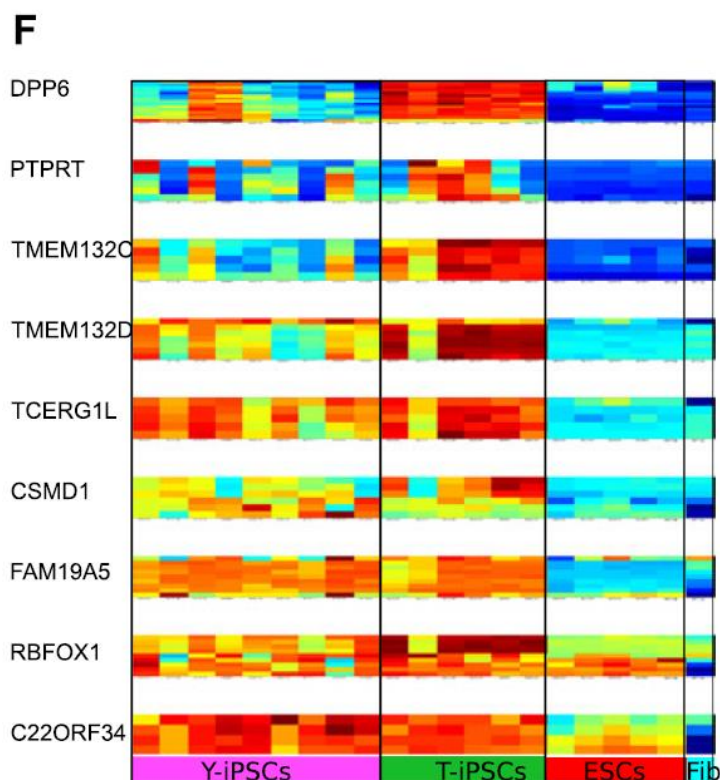
Class I Class II Class III Class IV



Εικόνα 7E: Περίληψη των κατηγοριών της παρεκκλίνουσας μεθυλίωσης του DNA που βρέθηκαν σε όλα τα iPSCs.

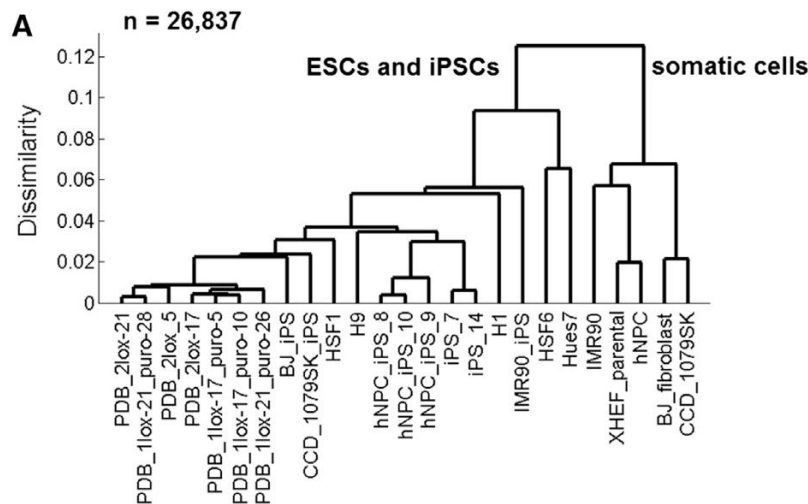
Μια σχετικά πρόσφατη μελέτη (Ruiz et al. 2012), η οποία χαρακτήρισε τα επίπεδα μεθυλίωσης του DNA σε 17 iPSCs που παράγονται από διάφορους τύπους κυττάρων χρησιμοποιώντας τους παράγοντες Yamanaka, εντόπισε 9 γονίδια που βρέθηκε ότι έχουν παρεκκλίνουσα μεθυλίωση του DNA ανεξάρτητα από την κυτταρική πηγή που χρησιμοποιείται. Οι ερευνητές εξέτασαν τις τιμές μεθυλίωσης αυτών των 9 γονιδίων στο σύνολο των δεδομένων τους και βρέθηκε ότι μόνο 4 γονίδια (FAM19A5, CSMD1, TCERG1L και TMEM132D) εμφάνιζαν παρεκκλίνουσα μεθυλίωση σε όλα τα iPSCs, ενώ 2 άλλα γονίδια (DPP6 και TMEM132C) εμφάνιζαν παρεκκλίνουσα μεθυλίωση μόνο σε T-iPSCs. Τα επίπεδα μεθυλίωσης του DNA των υπόλοιπων 3 γονιδίων (RBFOX1, C22ORF34 και PTPRT) δεν έδειξαν εμφανή επαναλαμβανόμενη παρεκκλίνουσα μεθυλίωση, όπως φαίνεται στην Εικόνα 7F. Η απόκλιση μεταξύ των δεδομένων τους (Ruiz et al. 2012) και των αποτελεσμάτων τους (Planello et al. 2014) μπορεί να οφείλεται σε διαφορές στο πρωτόκολλο επαναπρογραμματισμού, στην καλλιέργεια κυττάρων ή στα κύτταρα δότες.





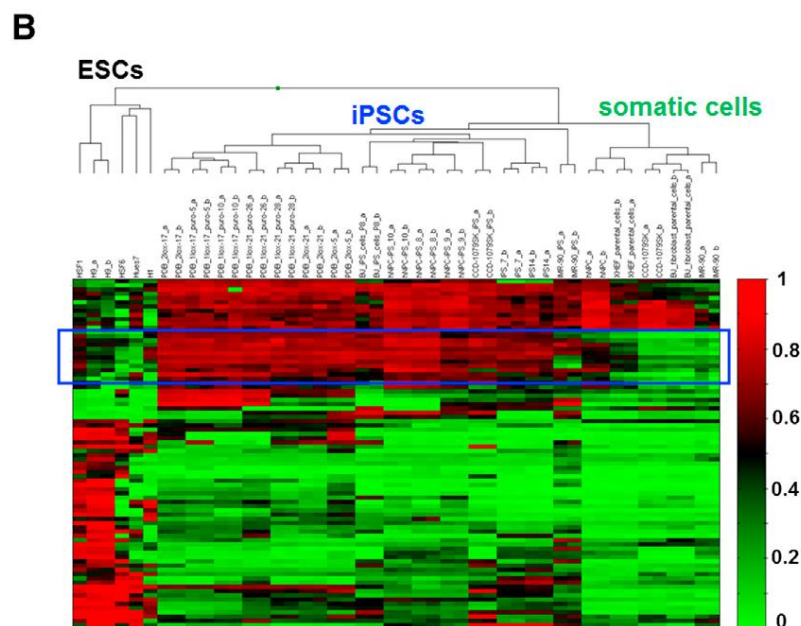
Εικόνα 7F: Η μεθυλίωση του DNA των CpGs στο σημείο έναρξης της μεταγραφής 9 γονιδίων που εμφανίζουν παρεκκλίνουσα μεθυλίωση του DNA σε όλα τα iPSCs (Ruiz et al. 2012)

Οι (Huang et al. 2014) διερεύνησαν εάν τα hiPSCs εμφανίζουν ένα μοναδικό προφίλ μεθυλίωσης CpG λόγω είτε της υπολειπόμενης μνήμης σωματικών κυττάρων είτε της παρεκκλίνουσας μεθυλίωσης σε επιλεγμένες γονιδιωματικές περιοχές σε σύγκριση με τα hESCs. Διερεύνησαν αυτό το θέμα αναλύοντας τη μεθυλίωση CpG σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων ολοδύναμων κυττάρων ( $n = 269$ ) προερχόμενα από πολλαπλά εργαστήρια, αυξάνοντας έτσι τη δύναμη των στατιστικών αναλύσεων. Εξέτασαν για πρώτη φορά τα προφίλ μεθυλίωσης 25 κυτταρικών σειρών, συμπεριλαμβανομένων πέντε hESC, πέντε γονεϊκών σωματικών κυττάρων και 15 κυτταρικών σειρών hiPSCs που καλύπτουν τα hiPSCs που παράγονται τόσο από μεθόδους που περιέχουν φορέα όσο και χωρίς φορέα. Η ανάλυση ιεραρχικής ομαδοποίησης έδειξε ότι τα hiPSCs είναι παρόμοια με τα hESC, αλλά διαφέρουν από τα σωματικά κύτταρα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 8Α.



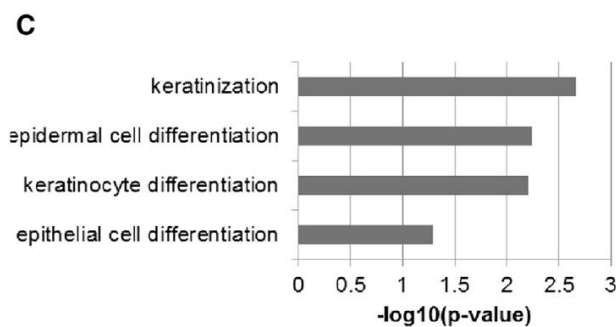
**Εικόνα 8A:** Ανάλυση ομαδοποίησης του προφίλ μεθυλίωσης σε 26.837 τοποθεσίες CpG σε hiPSCs, σωματικά κύτταρα και hESCs (Huang et al. 2014)

Για τον προσδιορισμό της διαφορικής μεθυλίωσης μεταξύ hiPSCs και hESCs, οι ερευνητές χρησιμοποίησαν ένα στατιστικά αυστηρό cutoff και απαίτησαν μια απόλυτη διαφορά μεθυλίωσης ( $\Delta\beta$ ) 0,3. Διαπίστωσαν ότι τα προφίλ μεθυλίωσης από 82 τοποθεσίες CpG σε 66 γονίδια μπορούν αποτελεσματικά να ομαδοποιήσουν τα hiPSCs ξεχωριστά είτε από τα hESC είτε από τα γονικά σωματικά κύτταρα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 8B (Huang et al. 2014).



Εικόνα 8B: Αναπαράσταση χάρτη θερμότητας των 82 υπογραφών CpGs σε 15 hiPSCs, πέντε hESC και πέντε σωματικά κύτταρα. Το μπλε κουτί επισημαίνει τα CpGs που υφίστανται de novo μεθυλίωση σε hiPSCs (Huang et al. 2014).

Η ανάλυση Gene Ontology (GO) αποκάλυψε ότι τα γονίδια υπογραφής συσχετίστηκαν με τη διαφοροποίηση και την κερατινοποίηση επιδερμικών κυττάρων, όπως φαίνεται στην Εικόνα 8C. Είναι ενδιαφέρον ότι οι συγκρίσεις της υπογραφής μεθυλίωσης hiPSC μεταξύ των hESC, hiPSCs και σωματικών κυττάρων αποκάλυψαν ότι το πρότυπο μεθυλίωσης των hiPSCs μοιάζει με αυτό των σωματικών κυττάρων, εκτός από 12 θέσεις CpG που φάνηκαν να είναι μοναδικά υπερμεθυλιωμένες σε σύγκριση με τα δύο hESC και τα σωματικά κύτταρα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 8B. Αυτό το αποτέλεσμα έδειξε ότι η υπογραφή μεθυλίωσης hiPSC αποτελείται τόσο από την υπολειμματική σωματική μνήμη όσο και από συγκεκριμένες θέσεις CpG που υπόκεινται σε de novo μεθυλίωση (Huang et al. 2014).



Εικόνα 8C: Ανάλυση GO των γονιδίων υπογραφής ( $n = 66$ ). Οι τιμές p-values που φαίνονται στο σχήμα προσαρμόστηκαν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Benjamini-Hochberg (Huang et al. 2014).

Στη μελέτη των Nishino et al 2011 τα προφίλ μεθυλίωσης του DNA σε επίπεδο ολόκληρου του γονιδιώματος στα ανθρώπινα iPSCs ήταν παρόμοια με αυτά των hESC, ανεξάρτητα από τους τύπους των γονεϊκών κυττάρων οι οποίοι παρήγαγαν τα iPSCs. Περίπου το 1-2% των εξεταζόμενων θέσεων CpG ταυτοποιήθηκαν ως διαφορετικά μεθυλιωμένες περιοχές ειδικές σε βλαστοκύτταρα (DMRs), οι οποίες εμφανίζουν τις ίδιες καταστάσεις μεθυλίωσης του DNA σε hiPSCs και hESC, αλλά όχι στα γονεϊκά κύτταρα που παρήγαγαν τα hiPSCs. Περίπου το 80% των ειδικών περιοχών σε βλαστοκύτταρα DMRs εμφανίζει υπερμεθυλίωση σε σύγκριση με τα σωματικά κύτταρα. Κατά τη διάρκεια του επαναπρογραμματισμού, οι υποκινητές των



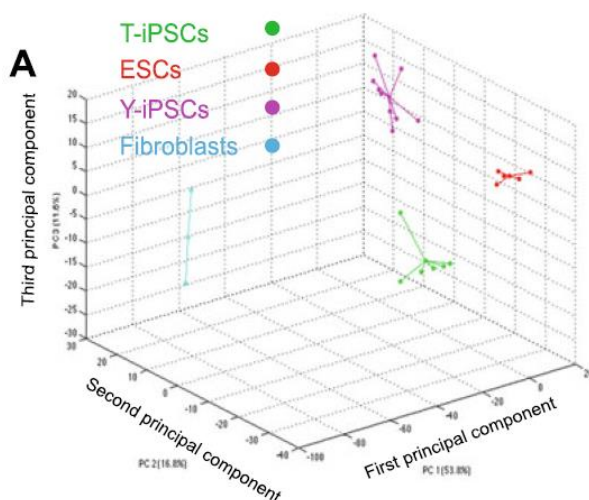
γονιδίων OCT-3/4 και NANOG απομεθυλιώνονται στα κύτταρα hiPSCs (Takahashi et al. 2006) ενώ οι περιοχές DMRs μεθυλιώνονται.

Ο υψηλότερος αριθμός υπερμεθυλιωμένων περιοχών DMRs σε hiPSCs δείχνει ότι οι παράγοντες επαναπρογραμματισμού ενεργοποιούν μόνο έναν περιορισμένο αριθμό γονιδίων που σχετίζονται με την κατάσταση των βλαστοκυττάρων, μέσω απομεθυλίωσης συγκεκριμένων DMRs, παράλληλα με τη μεθυλίωση των περισσότερων γονιδίων που σχετίζονται με διαφοροποίηση κατά τον επαναπρογραμματισμό. Τα OCT-3/4 και NANOG έχουν χρησιμοποιηθεί ως επιγενετικοί δείκτες για iPSCs (Yu et al. 2007) (Huangfu et al. 2008). Από τη συγκριτική ανάλυση των προφίλ μεθυλίωσης DNA και της έκφρασης γονιδίων, οι Huang et al. 2014 εντόπισαν 8 γονίδια που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως νέοι επιγενετικοί δείκτες στην αξιολόγηση των hiPSCs. Συγκεκριμένα, τα γονίδια EPHA1, PTPN6, RAB25 και SALL4 είναι υπομεθυλιωμένα και εκφράζονται ιδιαίτερα σε hESCs / hiPSCs. Από την άλλη πλευρά, τα GBP3, LYST, SP100 και UBE1L υπερμεθυλιώνονται και καταστέλλονται (Nishino et al. 2011)

Σύμφωνα με τη μελέτη των Nishino et al 2016, οι DMRs ανιχνεύθηκαν επίσης ως ένα μικρό κλάσμα μεταξύ των hESCs και hiPSCs. Αυτές οι DMRs, ωστόσο, αντιπροσώπευαν μη φυσιολογικές θέσεις μεθυλίωσης σε hiPSCs και δεν ήταν σταθερές μεταξύ των 22 διαφορετικών κλώνων hiPSCs. Αν και δεν ανιχνεύθηκε παρεκκλίνουσα μεθυλίωση DNA σε όλα τα hiPSCs, τέτοιες DMRs βρέθηκαν κατά τη σύγκριση hiPSCs από μεμονωμένη κυτταρική σειρά σε σχέση με τα hESCs. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η παρεκκλίνουσα μεθυλίωση DNA σε hiPSCs εμφανίζεται τυχαία στο γονιδίωμα. Σε σύγκριση με τα hESCs, το 80% των περιοχών της παρεκκλίνουσας μεθυλίωσης ήταν υπερμεθυλιωμένα. Τα εντυπωμένα γονίδια, H19, IGF2 και MEG3, έχουν αναφερθεί ότι είναι ασταθή στις ανθρώπινες κυτταρικές σειρές ESCs (Rugg-Gunn et al. 2005) (Rugg-Gunn et al. 2007). Το γονίδιο Dlk1- Dio3 έχει επίσης αναφερθεί ότι εμφανίζει παρεκκλίνουσα καταστολή στα περισσότερα iPSCs ποντικού (Stadtfield et al. 2010). Από τα 87 εντυπωμένα γονίδια που εξετάστηκαν, τα MEG3 και H19, βρέθηκαν επίσης να είναι υπερμεθυλιωμένα κατά παρέκκλιση σε διάφορες κυτταρικές σειρές hiPSCs (Nishino et al. 2016).

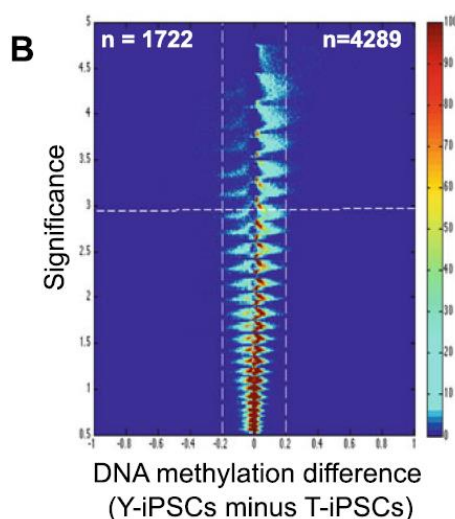
## 2.5 Οι παρεκκλίσεις της μεθυλίωσης του DNA που σχετίζονται με το Y-iPSC και το T-iPSC ανήκουν σε διαφορετικές κατηγορίες

Αν και προηγούμενες μελέτες έχουν εντοπίσει επαναλαμβανόμενες διαφοροποιήσεις της μεθυλίωσης του DNA σε iPSCs σε σύγκριση με τα ESCs, δεν έχει γίνει συστηματική μελέτη για να καθοριστεί πώς η έκταση και ο τύπος των παρεκκλίσεων μεθυλίωσης του DNA εξαρτώνται από τους παράγοντες που χρησιμοποιούνται για τον επαναπρογραμματισμό. Η μελέτη των (Planello et al. 2014) σχεδιάστηκε ειδικά για να εντοπίσει αυτές τις διαφορές. Οι επιστήμονες πραγματοποίησαν μια ανάλυση (Principal Component Analysis) των τιμών μεθυλίωσης του DNA σε επίπεδο ολόκληρου του γονιδιώματος και παρατήρησαν ότι αν και όλα τα iPSCs είναι πιο κοντά στα ESCs από ότι στους ινοβλάστες, διαχωρίστηκαν σε δύο διαφορετικές ομάδες σύμφωνα με τους παράγοντες επαναπρογραμματισμού που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή τους, όπως φαίνεται στην Εικόνα 9Α.



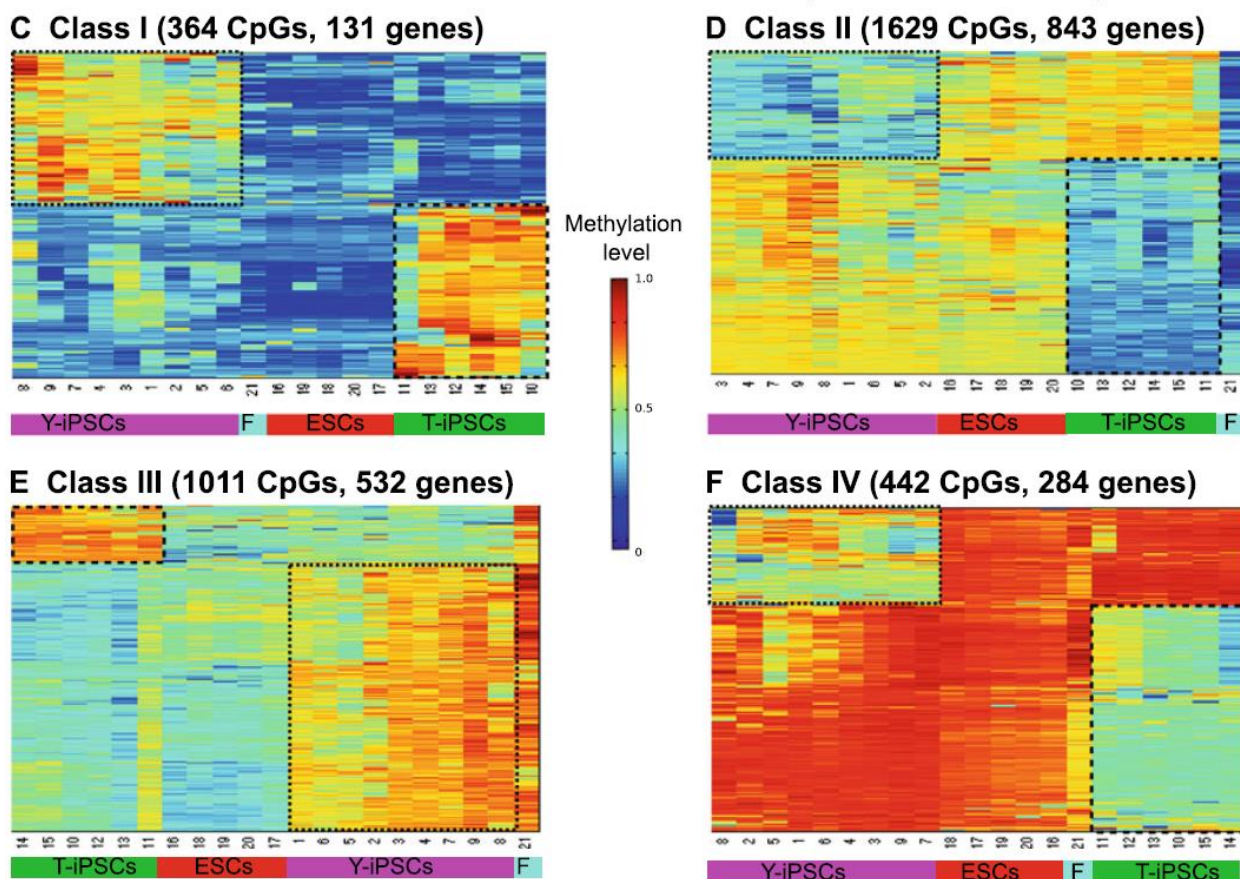
Εικόνα 9: Οι παρεκκλίσεις της μεθυλίωσης του DNA που βρίσκονται μόνο σε Y- ή T-iPSCs. Α) Η ανάλυση (Principal Component Analysis) δείχνει ότι τα προφίλ μεθυλίωσης των Y-iPSCs, T-iPSCs και ESCs διαχωρίζεται σε ξεχωριστές ομάδες.

Οι ερευνητές προσδιόρισαν 6.011 CpGs που μεθυλιώθηκαν διαφορετικά μεταξύ των T-iPSCs και Y-iPSCs. Ειδικότερα, 1.722 CpGs υπερμεθυλιώθηκαν στα T-iPSCs και 4.289 CpGs υπερμεθυλιώθηκαν στα Y-iPSCs, όπως φαίνεται στην Εικόνα 9Β.



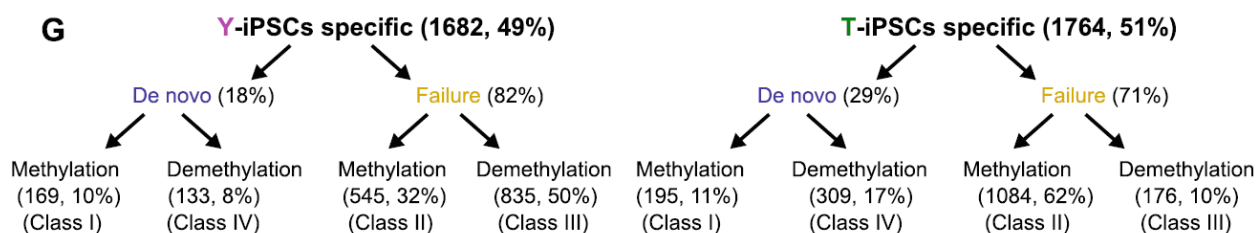
**Εικόνα 9B:** Volcano plots όλων των θέσεων CpG. Η διαφορά τιμής στη μεθυλίωση του DNA μεταξύ των Y-iPSCs και T-iPSCs απεικονίζεται στον άξονα x και η τιμή p-value μεταξύ των Y-iPSCs και T-iPSC σε κλίμακα λογαρίθμου  $-\log_{10}$  απεικονίζεται στον άξονα y. Τα CpGs που διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των 2 υποτύπων εμφανίζονται στην επάνω αριστερή γωνία (σημαντικά υπερμεθυλιωμένα σε T-iPSCs) και στην επάνω δεξιά γωνία (σημαντικά υπερμεθυλιωμένα σε Y-iPSCs).

Διαπιστώθηκε ότι αυτά τα CPGs δεν αποτελούν υποσύνολο της παρεκκλίνουσας μεθυλίωσης του DNA στις περιοχές CpGs που βρίσκονται σε όλα τα iPSCs, όπως φαίνεται στην Εικόνα 7. Μεταξύ αυτών των 6.011 CpGs παρατηρήθηκε ότι και στα δύο είδη, T-iPSCs και Y-iPSCs, αντιστοιχούσαν και οι 4 κατηγορίες παρεκκλίνουσας μεθυλίωσης του DNA, όπως φαίνεται στην Εικόνα 9C έως G. Είναι ενδιαφέρον ότι, τόσο τα T-iPSCs όσο και τα Y-iPSCs είχαν λιγότερες de novo παρεκκλίσεις (κλάσεις I και IV) από ό,τι αναμενόταν τυχαία ( $p < 0,001$ ) και περισσότερες παρεκκλίσεις αποτυχίας (κλάσεις II και III) από ό,τι αναμενόταν τυχαία ( $p < 0,001$ ). Επιπλέον, τα T-iPSCs είχαν περισσότερες παρεκκλίσεις της κατηγορίας II και λιγότερες της κατηγορίας III σε σύγκριση με τα Y-iPSCs, όπως φαίνεται στην Εικόνα 9G.



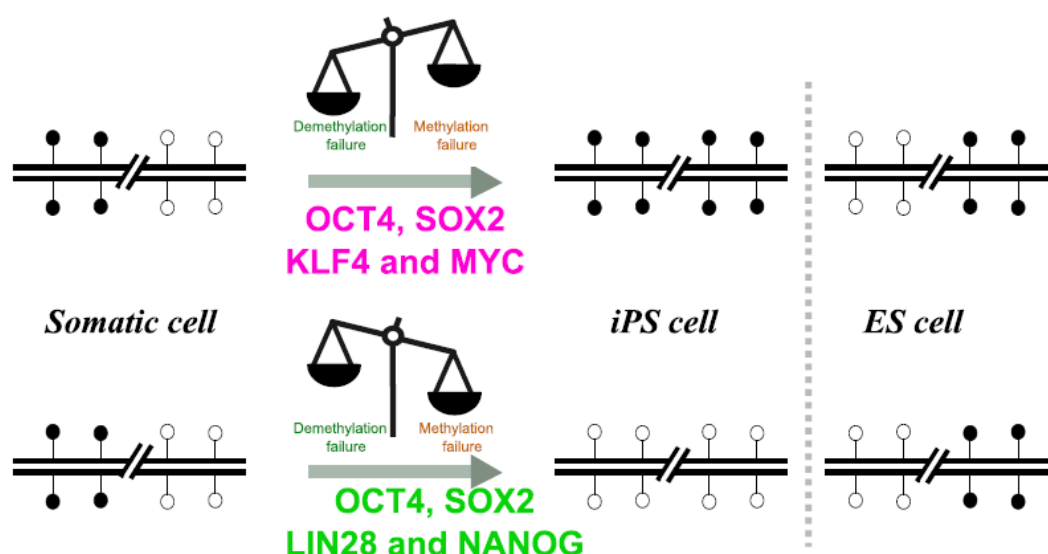
Εικόνα 9C: Τα CpGs που υπομεθυλιώνονται σε ινοβλάστες αλλά εμφανίζουν παρεκκλίνουσα μεθυλίωση στα iPSCs. D) Τα CpGs που υπομεθυλιώνονται σε ινοβλάστες αλλά δεν είναι μεθυλωμένα στα iPSCs. E) Τα CpGs που υπερμεθυλιώνονται στους ινοβλάστες αλλά εμφανίζουν παρεκκλίνουσα υπερμεθυλίωση. F) Τα CpGs που υπερμεθυλιώνονται στους ινοβλάστες αλλά εμφανίζουν παρεκκλίνουσα απομεθυλίωση στα iPSCs.

Έτσι, τα Y-iPSCs “υποφέρουν” κυρίως από αποτυχία απομεθυλίωσης, ενώ τα T-iPSCs “υποφέρουν κυρίως” από αποτυχία μεθυλίωσης. Οι ερευνητές παρατήρησαν, επίσης, ότι οι de novo παρεκκλίσεις (τόσο μεθυλίωση όσο και απομεθυλίωση) υπάρχουν κατά προτίμηση όχι σε CpG νησίδες τόσο στα Y-iPSCs όσο και στα T-iPSC, ενώ οι παρεκκλίσεις αποτυχίας (Κατηγορία II και Κατηγορία III) παρατηρούνται στις νησίδες CpG. Οι επιστήμονες σημείωσαν ότι περίπου το 57% (3446 από 6011 CpGs που προσδιορίζονται στην Εικόνα 9B) των CpGs που έδειξαν επαναλαμβανόμενες διαφορές μεταξύ Y-iPSCs και T-iPSCs δεν εμπίπτουν στην Κατηγορία I ή IV. Είναι ενδιαφέρον ότι, CpGs που εμφανίζουν παρεκκλίνουσα μεθυλίωση (Κατηγορία I) στα Y-iPSCs και T-iPSCs εντοπίζονται σε θέσεις έναρξης της μεταγραφής (TSS).



Εικόνα 9G: Περίληψη των κατηγοριών της παρεκκλίνουσας μεθυλίωσης του DNA που βρέθηκαν μόνο σε Y-iPSCs (αριστερά) ή T-iPSCs (δεξιά) αλλά όχι και στα δύο.

Διαφορετικοί συνδυασμοί παραγόντων επαναπρογραμματισμού οδηγούν σε διαφορές στον τύπο και την έκταση των παρεκκλίσεων μεθυλίωσης του DNA που παρατηρούνται στα iPSCs. Είναι πιθανό ότι οι διαφορές στο προφίλ μεθυλίωσης του DNA μεταξύ των Y-iPSCs και T-iPSCs μπορεί να οδηγήσουν σε λεπτές φαινοτυπικές συνέπειες ακόμη και όταν ξεκινούν με τον ίδιο ακριβώς τύπο κυττάρου δότη. Οι επιστήμονες προτείνουν ότι οι διαφορές μεταξύ των T-iPSCs και Y-iPSCs που επισημάνθηκαν παραπάνω θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν πλεονεκτικά για την επίτευξη του βέλτιστου επαναπρογραμματισμού διαφόρων τύπων κυττάρων δότη, ανάλογα με τα συνολικά επίπεδα μεθυλίωσης του DNA του γονιδιώματός τους.

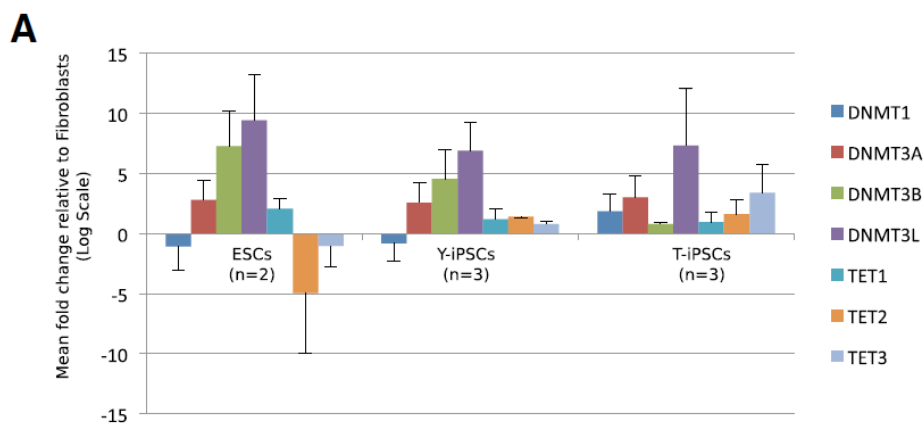


Εικόνα 9H: Μοντέλο που συσχετίζει τους παράγοντες επαναπρογραμματισμού και τους τύπους παρεκκλίσεων της μεθυλίωσης του DNA. Μια υποθετική γονιδιωματική περιοχή που δείχνει τέσσερα CpGs. Ο λευκός δίσκος αντιπροσωπεύει μη μεθυλιωμένο CpG και ο μαύρος δίσκος αντιπροσωπεύει μεθυλιωμένο CpG. Ο επαναπρογραμματισμός με τους παράγοντες Yamanaka οδηγεί σε σωστή

μεθυλίωση αλλά αποτυχία απομεθυλίωσης, οδηγώντας στον εντοπισμό των παρεκκλίσεων απομεθυλίωσης του DNA σε αυτά τα iPSCs σε σχέση με τα ESCs. Ομοίως, ο επαναπρογραμματισμός με τους παράγοντες Thomson οδηγεί σε σωστή απομεθυλίωση αλλά αποτυχία μεθυλίωσης, οδηγώντας στον εντοπισμό των παρεκκλίσεων της μεθυλίωσης του DNA σε αυτά τα iPSCs σε σχέση με τα ESCs (Planello et al. 2014).

## 2.6 Ο εντοπισμός των παρεκκλίσεων σε περιοχές δέσμευσης παραγόντων επαναπρογραμματισμού αποτελεί πιθανή αιτία των παρεκκλίσεων μεθυλίωσης του DNA σε Y-iPSCs και T-iPSCs

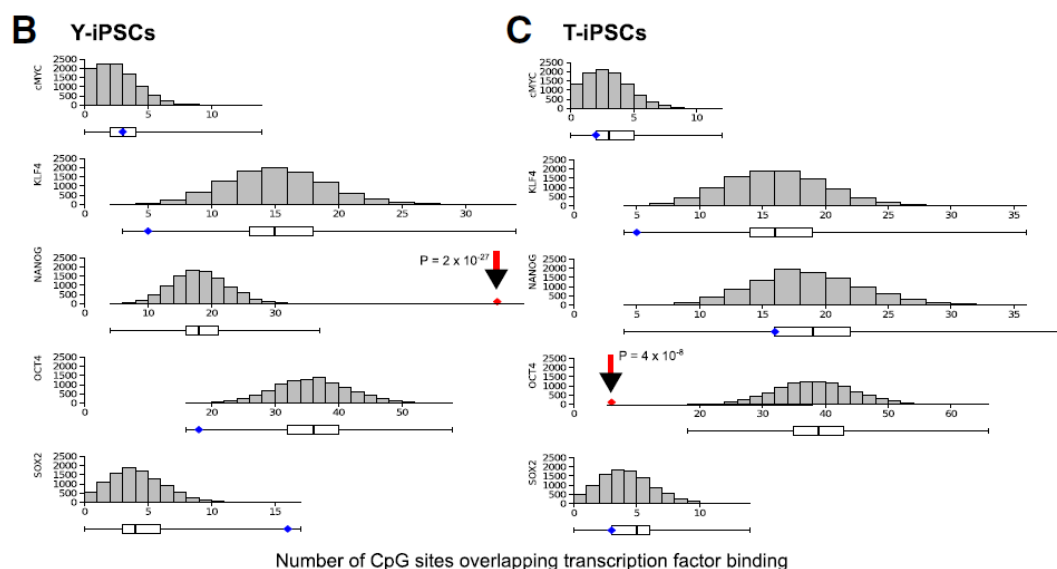
Μεταξύ άλλων, οι διαφορές στις κατηγορίες των παρεκκλίσεων μεταξύ των Y-iPSCs και T-iPSCs μπορεί να οφείλονται σε διαφορετικά επίπεδα ενζύμων μεθυλίωσης και απομεθυλίωσης του DNA κατά τον επαναπρογραμματισμό ή μπορεί σε διαφορετική στόχευση αυτών των ενζύμων στις γονιδιωματικές περιοχές που περιέχουν τις παρεκκλίσεις της μεθυλίωσης του DNA. Για να προσδιορισθεί εάν τα επίπεδα και η στόχευση των ενζύμων της μεθυλίωσης του DNA μπορεί να συμβάλλουν στις παρατηρούμενες παρεκκλίσεις, ελέγχθηκε πρώτα εάν τα επίπεδα των ενζύμων της μεθυλίωσης και της απομεθυλίωσης του DNA εμφανίζουν παρέκκλιση (Planello et al. 2014). Παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα του ενζύμου DNMT3b ήταν χαμηλότερα στα T-iPSCs απ' ό,τι στα ESCs ή τα Y-iPSCs, το οποίο ενδεχομένως να συμβάλλει στη δημιουργία ελαττωμάτων στη de novo μεθυλίωση στα Y-iPSCs, όπως φαίνεται στην Εικόνα 10A. Επιπλέον, τα επίπεδα του ενζύμου TET3 ήταν υψηλότερα στα T-iPSCs από τα ESCs ή τα Y-iPSCs γεγονός που ενδεχομένως συμβάλλει στην υπερβολική απομεθυλίωση στα Y-iPSCs, όπως φαίνεται στην Εικόνα 10A.





Εικόνα 10: Επίπεδα ενζύμων μεθυλίωσης και απομεθυλίωσης του DNA και αλληλοεπικάλυψη των περιοχών παρεκκλίνουσας μεθυλίωσης με τις γενωμικές θέσεις πρόσδεσης παραγόντων επαναπρογραμματισμού. Α) Επίπεδα έκφρασης των ενζύμων που εμπλέκονται στη μεθυλίωση και απομεθυλίωση σε ολοδύναμα κύτταρα με qPCR. Τα δεδομένα μετατράπηκαν σε log2 και κανονικοποιήθηκαν σε επίπεδα αυτών των ενζύμων σε ανθρώπινους ινοβλάστες. Οι τιμές που εμφανίζονται είναι ο μέσος όρος του ακόλουθου αριθμού δειγμάτων: n = 2 (ESCs), n = 3 (Y-iPSCs) και n = 3 (T-iPSCs).

Για να προσδιορισθεί εάν η στόχευση του συμπλόκου μεθυλίωσης του DNA σε συγκεκριμένους γονιδιωματικούς τόπους από τους παράγοντες επαναπρογραμματισμού μπορεί να συμβάλλει στη δημιουργία των παρατηρούμενων παρεκκλίσεων του DNA, αναλύθηκαν παραλλαγές της μεθυλίωσης σε γονίδια που στοχεύουν οι συγκεκριμένοι παράγοντες επαναπρογραμματισμού (Planello et al. 2014). Οι ερευνητές ανέλυσαν τα δημοσιευμένα δεδομένα ChIPseq και ποσοτικοποίησαν τις παρεκκλίσεις της μεθυλίωσης του DNA σε περιοχές που δεσμεύονται από παράγοντες επαναπρογραμματισμού στα ESCs (Lister et al. 2009). Παρατήρησαν ότι τα CpGs με παρεκκλίνουσα μεθυλίωση του DNA (Κατηγορίες I και II) στα Y-iPSCs εντοπίζονται κυρίως ( $P = 2 \times 10^{-27}$ ) στις θέσεις σύνδεσης του μεταγραφικού παράγοντα NANOG στα ESCs, όπως φαίνεται στην Εικόνα 10B. Επιπλέον, τα CpGs με παρεκκλίνουσα μεθυλίωση του DNA (Κατηγορίες I και II) στα T-iPSCs εντοπίζονται κυρίως ( $P = 4 \times 10^{-8}$ ) στις θέσεις σύνδεσης του γονιδίου OCT4, όπως φαίνεται στην Εικόνα 10C.



Εικόνα 10B,C: Προσομοίωση τυχαίας δειγματοληψίας για τον προσδιορισμό της κατανομής του αναμενόμενου αριθμού γονιδίων που είναι στόχοι του υποδεικνυόμενου παράγοντα επαναπρογραμματισμού και έχουν παρεκκλίσεις της μεθυλίωσης του DNA στις θέσεις CpGs που αλληλεπικαλύπτονται. Τα ιστογράμματα και οι γραφικές παραστάσεις αντιπροσωπεύουν την μηδενική κατανομή για την αλληλοεπικάλυψη μεταξύ τυχαίων δειγματοληπτικών παρεκκλίσεων μεθυλίωσης του DNA και κάθε θέσης σύνδεσης μεταγραφικού παράγοντα. Τα μπλε σημεία αντιπροσωπεύουν τον πειραματικά παρατηρούμενο αριθμό αλληλοεπικάλυψης μεταξύ των παρεκκλίσεων μεθυλίωσης του DNA στα Y-iPSCs (B) ή T-iPSCs (C) και κάθε περιοχή δέσμευσης μεταγραφικού παράγοντα. Τα κόκκινα επισημαίνουν μια σειρά αλληλοεπικαλύψεων που δεν εμπίπτουν πλήρως στην μηδενική κατανομή.

Η στατιστικά σημαντική αύξηση των παρεκκλίσεων στα Y-iPSCs σε CpGs εντός των γονιδιωματικών περιοχών που δεσμεύονται από το NANOG υποδηλώνει ότι ορισμένες από τις παρεκκλίσεις CpG μπορεί να είναι συνέπεια ανεπαρκούς στόχευσης της μεθυλτρανσφεράσης του DNA ή του μηχανισμού απομεθυλίωσης του DNA σε θέσεις CpG και μπορεί να συμβάλλουν στις διαφορές στα προφίλ μεθυλίωσης μεταξύ των Y-iPSCs και T-iPSCs, όπως φαίνεται στις Εικόνες 6B και 9A. Ο κατάλογος όλων των γονιδίων των οποίων η θέση έναρξης της μεταγραφής περιέχει ένα ή περισσότερα παρεκκλίνοντα μεθυλιωμένα CpG παρέχεται στον Πίνακα 1.

Παρατηρήθηκε ότι η προσέγγιση που χρησιμοποιείται για τη δημιουργία προφίλ μεθυλίωσης του DNA βασίζεται στη μετατροπή του όξινου θειώδους άλατος και επομένως δεν μπορεί να διακρίνει μεταξύ της 5-μεθυλκυτοσίνης (5-mC) και της 5-υδροξυμεθυλοκυτοσίνης (5-hmC). Αυτό σημαίνει ότι τα CpGs που αναγνωρίζονται ως μεθυλιωμένα μπορούν να είναι 5-mC ή 5-hmC. Αυτός ο τεχνικός περιορισμός δεν αναιρεί τη διαπίστωση ότι οι παρεκκλίσεις των Y-iPSCs αποτελεί κυρίως αποτυχία απομεθυλίωσης του DNA. Ακόμα κι αν ορισμένες από τις περιοχές που ταξινομούνται ως αποτυχία απομεθυλίωσης είναι στην πραγματικότητα 5hmC (αντί για 5mC), οι ίδιες περιοχές είναι εντελώς μη μεθυλιωμένες στα T-iPSCs. Επομένως, τα Y-iPSCs αποτυγχάνουν στην απομεθυλίωση αυτών των περιοχών, είτε διατηρώντας τη 5mC είτε μετατρέποντας τη σε 5hmC, αλλά δεν μπόρεσαν να μετατρέψουν περαιτέρω σε μη μεθυλιωμένη κυτοσίνη (Planello et al. 2014).



**Πίνακας 1:** Λίστα των γονιδίων με παρεκκλίνουσα μεθυλίωση του DNA στον υποκινητή τους

**Table 1** List of Genes with aberrant promoter DNA methylation

iPSC type	Gene name	Position relative to TSS (base pairs)	Type of DNA methylation aberration	Overlapping TF binding site	Delta Beta (Y-iPSCs – T-iPSCs)
Y-iPSC	L1TD1	3887	failure to demethylate	SOX2, NANOG	0.205552761
Y-iPSC	ZNF202	–849	failure to demethylate	SOX2, NANOG	0.253028526
Y-iPSC	VRTN	–7	failure to demethylate	NANOG	0.204685702
Y-iPSC	ZNF281	–893	failure to demethylate	NANOG	0.217824711
Y-iPSC	PCBP1-AS1	1655	failure to demethylate	NANOG	0.260023778
Y-iPSC	CELF2	–602	failure to demethylate	NANOG	0.201570322
Y-iPSC	GCLC	2741	failure to demethylate	NANOG	0.209894956
Y-iPSC	CCDC85A	–1483	failure to demethylate	NANOG	0.231654822
Y-iPSC	GPC6	–1912	failure to demethylate	NANOG	0.2007506
Y-iPSC	RNF175	1925	failure to demethylate	NANOG	0.24800605
Y-iPSC	LAPTM4B	2519	failure to demethylate	NANOG	0.231217277
Y-iPSC	DUSP5	2071	failure to demethylate	NANOG	0.254193033
Y-iPSC	TDGF1	1259	failure to demethylate	NANOG	0.250850333
Y-iPSC	ZFP36L1	–544	failure to demethylate	KLF4	0.310706089
Y-iPSC	CDC16	–199, –212	spurious methylation	OCT4	0.362236745, 0.417741778
Y-iPSC	ADAR	–226	spurious methylation	OCT4	0.201398056
Y-iPSC	RPS23	3852	failure to demethylate	OCT4	0.234123761
Y-iPSC	ZBTB44	–1063, –1044	failure to demethylate	OCT4	0.234429233, 0.308618094
Y-iPSC	KIF3C	–433, –422	failure to demethylate	OCT4	0.348975978, 0.365098844
Y-iPSC	HORMAD2	–354, –363	failure to demethylate	OCT4	0.233920207, 0.252708599
Y-iPSC	PSMA8	23	failure to demethylate	cMYC	0.238296222
Y-iPSC	PLEKHG6	–189	failure to demethylate	cMYC	0.203390178
T-iPSC	TNFSF8	–1308	failure to methylate	NANOG	0.387689344
T-iPSC	FLJ31485	3444	failure to demethylate	NANOG	–0.340429706
T-iPSC	KCNH2	53	failure to methylate	KLF4	0.246395267
T-iPSC	TMEM132C	–365, –905	spurious methylation	KLF4, OCT4	–0.327425161, –0.3128155
T-iPSC	WDR45L	–469, –500	failure to methylate	OCT4	0.291398672, 0.308650794
T-iPSC	PABPC1L2A	1760	failure to methylate	cMYC	0.272031639

Genes within 5 kilobase window around TSS that were bound by cMYC, OCT4, SOX2, NANOG and KLF4 in human ESCs are shown. TF stands for transcription factor.

Οι ερευνητές χρησιμοποίησαν το εργαλείο Genomic Regions Enrichment of Annotations (McLean et al. 2010) για να προσδιορίσουν τον εντοπισμό συγκεκριμένων κατηγοριών γονιδίων. Οι γονιδιωματικές περιοχές με παρεκκλίνουσα μεθυλίωση του DNA στα Y-iPSCs εντοπίζονται σε γονίδια με ρόλο στη συντήρηση των βλαστικών κυττάρων (οι περιοχές αυτές είναι συνήθως υπερμεθυλιωμένες στους ινοβλάστες), ενώ οι γονιδιωματικές περιοχές με παρεκκλίνουσα μεθυλίωση του DNA στα T-iPSCs εντοπίζονται σε ειδικά γονίδια γονεαλογίας (τα οποία συνήθως υπομεθυλιώνονται στους ινοβλάστες), όπως φαίνεται στον Πίνακα 2.

**Πίνακας 2:** Ανάλυση οντολογίας των γονιδίων που σχετίζονται με διαφορετικά μεθυλιωμένες περιοχές (DMRs)

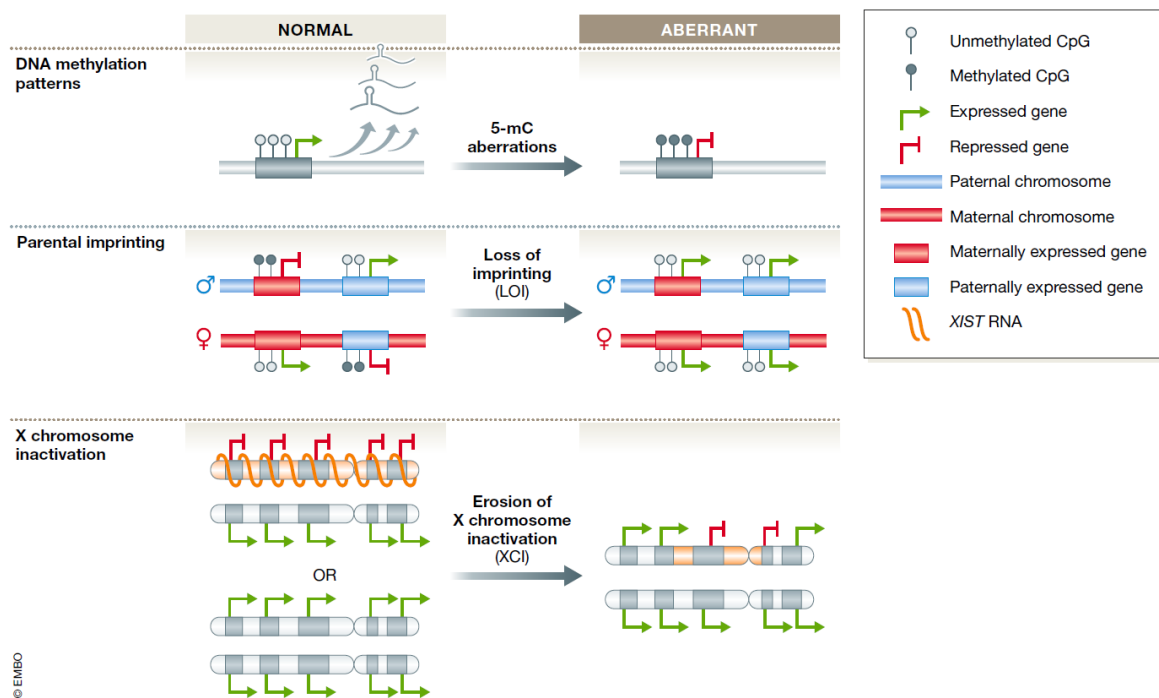
**Table 2 Gene ontology of genes associated with differentially methylated regions**

iPS type	GO Biological process	P-value	FDR Q-value	Fold enrichment
Y-iPSCs	Regulation of glial cell proliferation	$5.72 \times 10^{-13}$	$5.01 \times 10^{-9}$	8.2103
Y-iPSCs	Intestinal epithelial cell differentiation	$2.98 \times 10^{-11}$	$4.35 \times 10^{-8}$	10.7333
Y-iPSCs	Stem cell development	$6.19 \times 10^{-6}$	$9.04 \times 10^{-4}$	2.247
Y-iPSCs	Stem cell maintenance	$6.81 \times 10^{-6}$	$9.63 \times 10^{-4}$	2.2958
T-iPSCs	Eye development	$3.81 \times 10^{-11}$	$6.68 \times 10^{-8}$	6.5284
T-iPSCs	Spinal cord development	$3.68 \times 10^{-9}$	$3.58 \times 10^{-6}$	2.4715
T-iPSCs	Limb bud formation	$6.50 \times 10^{-6}$	$1.09 \times 10^{-3}$	3.1573

Μετά τη γονιμοποίηση, η μεθυλίωση του DNA διαγράφεται σε όλο το γονιδίωμα (καθολικά), φτάνει σε ένα ελάχιστο ποσοστό στο στάδιο της βλαστοκύστης και στη συνέχεια επανα-εγκαθιδρύεται κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης (Iurlaro et al. 2017). Παρόλο που τα ανθρώπινα κύτταρα της εσωτερικής κυτταρικής μάζας ICM εμφανίζουν πολύ χαμηλά επίπεδα μεθυλίωσης του DNA σε ολόκληρο το γονιδίωμα, τα hPSCs εμφανίζουν υπερμεθυλίωση σε επίπεδο καθολικού γονιδιώματος ακόμη και σε σύγκριση με τα σωματικά κύτταρα (Nishino et al. 2016). Επιπλέον, η μεθυλίωση του DNA σε ολόκληρο το γονιδίωμα είναι απαραίτητη για την επιβίωση του hPSC κυττάρου, καθώς η αποσιώπηση της DNA μεθυλοτρανσφεράσης 1 (DNMT1), η οποία είναι υπεύθυνη για να καταλύει την προσθήκη της 5-mC στον νέο αντιγραφόμενο κλώνο κατά τη φάση S, οδηγεί σε γρήγορο κυτταρικό θάνατο (Liao et al. 2015). Παρόμοιες συνέπειες παρατηρούνται μετά από χορήγηση των κυττάρων με το παράγοντα απομεθυλίωσης 5-αζα-2'-δεοξυκυτιδίνη (5-azadC) (Bar-Nur et al. 2012). Η αναγκαιότητα για την DNMT1 στα hPSCs έρχεται σε πλήρη αντίθεση με τα PSCs ποντικού, τα οποία είναι ανθεκτικά σε ταυτόχρονη αποσιώπηση των Dnmt1, Dnmt3a και Dnmt3b (Liao et al. 2015). Οι σημαντικές διαφορές στη μεθυλίωση του DNA μεταξύ ανθρώπινων κυττάρων βλαστοκύστης και hPSCs, μαζί με αποκλίσεις στη γονιδιακή έκφραση, αποτελούν σημαντικό παράγοντα στην έρευνα των naïve hPSCs. Επομένως, τα naïve hPSCs πρέπει να παρουσιάζουν παρόμοια επιγενετικά χαρακτηριστικά με αυτά των κυττάρων της ICM, συμπεριλαμβανομένης της ευρείας υπομεθυλίωσης και της αντίστασης στη μείωση της έκφρασης της DNMT1 (Theunissen et al. 2016).

Παρατηρήθηκαν παρεκκλίσεις της μεθυλίωσης του DNA σε διάφορες κυτταρικές σειρές των hPSCs κυττάρων (Lund et al. 2012). Αυτές περιλαμβάνουν παραλλαγές της μεθυλίωσης της 5-mC στους υποκινητές των γονιδίων, όπως φαίνεται στην Εικόνα 5, και στις μη κωδικές περιοχές, καθώς και σε υπολειμματικές υπογραφές της μεθυλίωσης του DNA σε iPSCs που έχουν προέλθει από τα σωματικά κύτταρα. Φαίνεται επομένως ότι προκύπτουν ομοιότητες μεταξύ των παρεκκλίσεων της μεθυλίωσης του DNA σε ειδικά γονίδια των hPSCs και αυτών που επικρατούν σε κακοήθειες (Konki et al. 2016) (Weissbein et al. 2017).

Καθώς τα σωματικά κύτταρα επαναπρογραμματίζονται σε hiPSCs, υφίστανται δυναμική αλλαγή στο επιγένομα τους και επιτυγχάνουν ολοδυναμία μέσω κατάλληλης αλλαγής στη μεθυλίωση DNA των ειδικών σε βλαστοκύτταρα DMRs υπό την πίεση τυχαίας υπερμεθυλίωσης σε ολόκληρο το γονιδίωμα. Κύτταρα που δεν έχουν υποστεί πλήρη επαναπρογραμματισμό των ειδικών σε βλαστοκύτταρα DMRs, ή που εμφανίζουν υπερβολική υπερμεθυλίωση στο γονιδιώμά τους, ενδέχεται να αποτύχουν να διατηρήσουν την ολοδυναμία κατά τη διάρκεια των πρώιμων περασμάτων. Ακολουθώντας τον επαναπρογραμματισμό που εξαρτάται από τα διαγονίδια, τα hiPSCs μοιάζουν περισσότερο με τα hESC με το να υφίστανται ανεξάρτητο διαγονιδιακό επαναπρογραμματισμό, ο οποίος αποτελείται από σύγκλιση του περιοδικού κύματος υπερμεθυλίωσης. Δεδομένου ότι η παρεκκλίνουσα υπερμεθυλίωση στα hiPSCs εμφανίζεται στοχαστικά σε όλο το γονιδίωμα, ο αριθμός των παρεκκλίνουσων θέσεων μεθυλίωσης και η αναλογία μεθυλίωσης των ειδικών σε βλαστοκύτταρα DMRs μπορεί να αντιπροσωπεύουν χρήσιμους επιγενετικούς δείκτες για την αξιολόγηση των hiPSCs στην αναγεννητική ιατρική. Επομένως, η επιγενετική έρευνα στον τομέα των hiPSCs όχι μόνο συμβάλλει στην αποσαφήνιση των μηχανισμών επαναπρογραμματισμού και διαφοροποίησης στη βιολογία, αλλά βοηθά επίσης στον καθορισμό ως προτύπου αξιολόγησης για τα hiPSCs σε ιατρικές εφαρμογές.

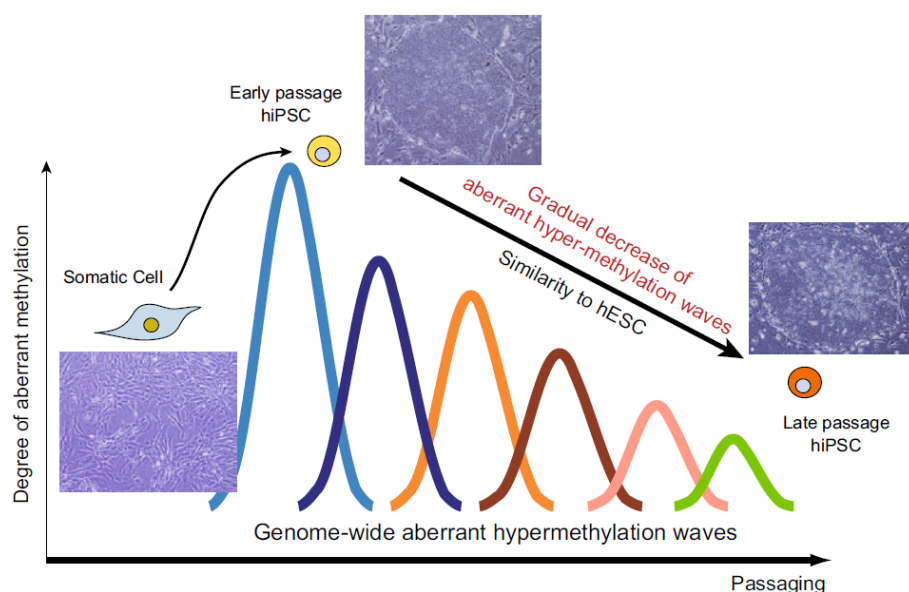


Εικόνα 11Α: Τύποι επιγενετικών παρεκκλίσεων σε hPSCs. Αρχή: Οι παρεκκλίσεις της μεθυλίωσης του DNA στα hPSCs προκαλούνται κυρίως από υπερμεθυλίωση του υποκινητή και οδηγούν στη σίγαση των γονιδίων. Κέντρο: Στα φυσιολογικά hPSCs, τα εντυπωμένα γονίδια εκφράζονται είτε από το πατρικό είτε από το μητρικό αλληλόμορφο. Η απώλεια του εντυπώματος περιλαμβάνει υπομεθυλίωση των εντυπωμένων DMRs, οδηγώντας σε παρεκκλίνουσα έκφραση και από τα δύο αλληλόμορφα των εντυπωμένων γονιδίων. Κάτω: Θηλυκά κύτταρα σε πρώιμη ανάπτυξη πριν από την εμφύτευση έχουν δύο ενεργά χρωμοσώματα X. Αργότερα στην ανάπτυξη, ξεκινά η αδρανοποίηση του χρωμοσώματος X -XCI-, η οποία επιτυγχάνεται από την 'επικάλυψη' του XIST mRNA και καταλήγει στη σίγαση ενός χρωμοσώματος X τυχαία. Πολλά hPSCs εμφανίζουν εκτροπή της σίγασης του XCI, η οποία χαρακτηρίζεται από καταστολή του XIST και μερική επανενεργοποίηση γονιδίων από το αποσιωπημένο X χρωμόσωμα. (Bar et al. 2019)

## 2.7 Επίδραση της μακροχρόνιας καλλιέργειας στην παρεκκλίνουσα μεθυλίωση του DNA

Οι διαφορές στα προφίλ γονιδιακής έκφρασης μεταξύ των κυτταρικών σειρών iPSCs αναφέρθηκαν από τους ερευνητές ότι μειώθηκαν κατά τη διάρκεια της μακροχρόνιας καλλιέργειας (Polo et al. 2010) (Chin et al. 2010). Ο αριθμός των παρεκκλίνουσων μεθυλιωμένων περιοχών στα κύτταρα hiPSCs ήταν υψηλός στα αρχικά στάδια της κυτταρικής καλλιέργειας και μειώθηκε καθώς αυξάνονταν τα κυτταρικά περάσματα. Τέτοιες κινητικές υποδηλώνουν ότι τα hiPSCs μοιάζουν περισσότερο με τα hESC κατά τη μακροχρόνια

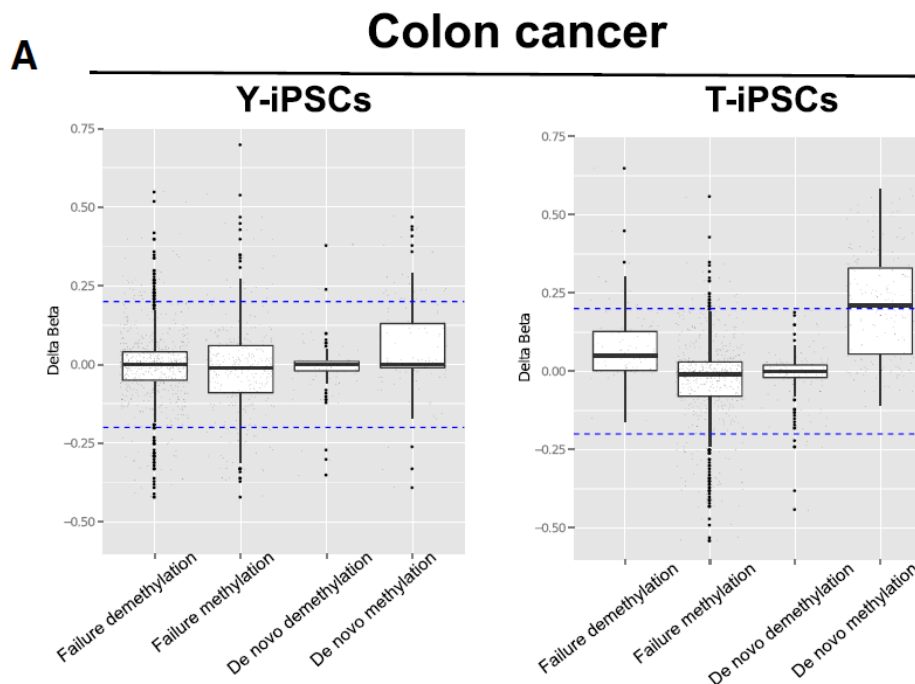
κυτταρική καλλιέργεια. Από την άλλη πλευρά, εμφανίστηκε επιπλέον παρεκκλίνουσα μεθυλίωση και στη συνέχεια μειώθηκε με την αύξηση των κυτταρικών περασμάτων. Τα hiPSCs μπορούν να διορθώσουν την παρεκκλίνουσα μεθυλίωση επαναλαμβάνοντας την ταχεία εμφάνιση και τη σταδιακή εξαφάνιση. Οι Nishino et al. 2011 αναφέρουν ότι τα iPSCs διατηρούν επιγενετική μνήμη των γονεϊκών κυττάρων τους. Ωστόσο, οι περισσότερες παρεκκλίνουσες μεθυλιωμένες θέσεις με τις ίδιες καταστάσεις μεθυλίωσης DNA όπως στα γονεϊκά κύτταρα, δεν ήταν σταθερές μεταξύ των πολλαπλών κυτταρικών σειρών hiPSCs που προέρχονται από τα ίδια γονεϊκά κύτταρα. Επιπλέον, αυτές οι κληρονομικές γενωμικές περιοχές έδειξαν επαναλαμβανόμενη ταχεία εμφάνιση και σταδιακή εξαφάνιση κατά την αύξηση των κυτταρικών περασμάτων, μαζί με άλλες παρεκκλίνουσες περιοχές (Nishino et al. 2011). Επομένως, οι κληρονομικές γενωμικές περιοχές αποτελούν μέρος της παρεκκλίνουσας μεθυλίωσης. Είναι ενδιαφέρον ότι σχεδόν όλες οι παρεκκλίνουσες θέσεις μεθυλίωσης ήταν υπερμεθυλιωμένες σε hiPSCs σε σύγκριση με εκείνες στα κύτταρα hESCs (Nishino et al. 2011), γεγονός που υποδηλώνει ότι οι παρεκκλίνουσες μεθυλιωμένες θέσεις στα hiPSCs, παρόλο που είναι υπομεθυλιωμένες στα γονεϊκά τους κύτταρα, γίνονται ασυνήθιστα υπερμεθυλιωμένες και στη συνέχεια διορθώνονται σε επίπεδα παρόμοια με αυτά των κυττάρων hESCs μειώνοντας την αναλογία μεθυλίωσής τους. Τα ανθρώπινα iPSCs επαναπρογραμματίζονται σταδιακά μέσω της «σύγκλισης» της περιοδικής παρεκκλίνουσας υπερμεθυλίωσης κατά τη διάρκεια μακροχρόνιας κυτταρικής καλλιέργειας, όπως φαίνεται στην Εικόνα 11.



Εικόνα 11: Μοντέλο επαναπρογραμματισμού στη μακροχρόνια κυτταρική καλλιέργεια. Τα ανθρώπινα iPSCs επαναπρογραμματίζονται διαγονιδιακά ανεξάρτητα, σταδιακά μέσω της «σύγκλισης» των παρεκκλίνουσων κυμάτων υπερμεθυλίωσης σε όλο το γονιδίωμα και στη συνέχεια γίνονται πιο παρόμοια με τα hESCs κατά τη διάρκεια μακροχρόνιας καλλιέργειας

## 2.8 Σχέση μεταξύ των παρεκκλίσεων μεθυλίωσης του DNA στα iPSCs και των παρεκκλίσεων μεθυλίωσης του DNA στον καρκίνο

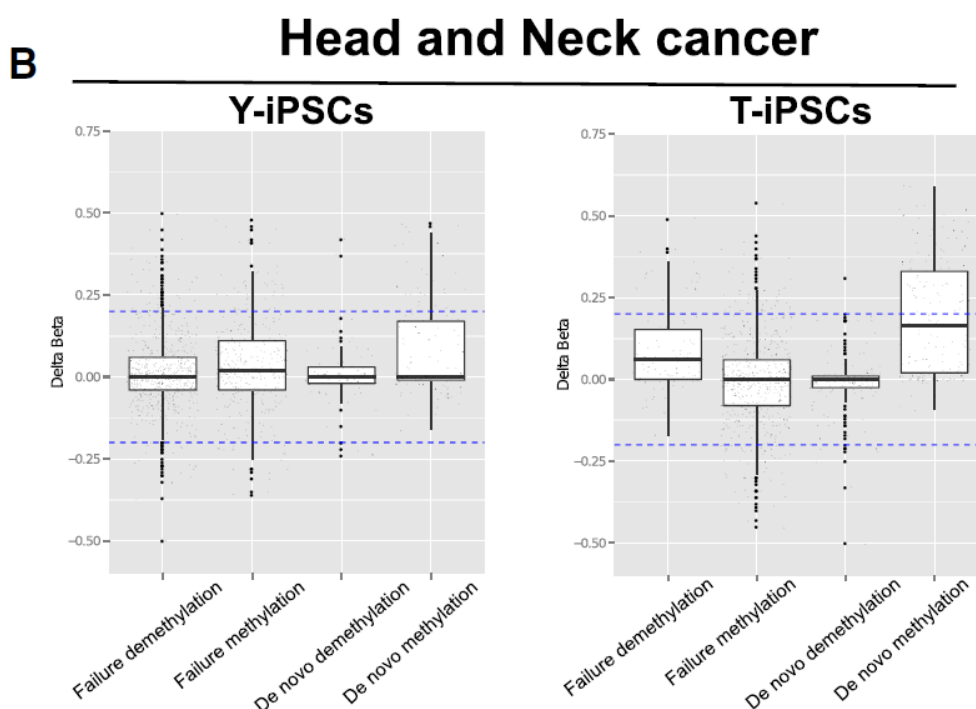
Μια σημαντική ανησυχία που σχετίζεται με τη χρήση των iPSCs με σκοπό την αναγεννητική ιατρική είναι η αυξημένη ογκογένεσή τους. Για να αποκτήσουν οι ερευνητές περαιτέρω πληροφορίες σχετικά με τις διαφορές στον τύπο των παρεκκλίσεων μεθυλίωσης του DNA που βρέθηκαν στα Y-iPSCs ή T-iPSCs, εξέτασαν εάν τα διαφορετικά μεθυλιωμένα CpGs συναντώνται επίσης στους διάφορους τύπους καρκίνων. Χρησιμοποίησαν δεδομένα, διαθέσιμα στο διαδίκτυο, αναφορικά με το προφίλ μεθυλίωσης του DNA από τη χρήση του ιστότοπου The Cancer Genome Atlas (Muzny et al. 2012). Στη συνέχεια αξιολόγησαν τη διαφορά στο πρότυπο μεθυλίωσης DNA μεταξύ καρκινικών ιστών και υγιών σε κάθε περιοχή CpG που αναγνωρίστηκε παρεκκλίνουσα μεθυλίωση στα Y-iPSCs ή στα T-iPSCs, όπως φαίνεται στην Εικόνα 12A.



Εικόνα 12A: Προφίλ των Y-iPSCs και των T-iPSCs με μεθυλιωμένες περιοχές. Διαφορά μεθυλίωσης του DNA μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών ιστών σε κάθε θέση CpG που αναγνωρίζεται με

παρεκκλίνουσα μεθυλίωση στα Y-iPSCs (αριστερό γράφημα) ή στα T-iPSCs (δεξιό γράφημα). Τα δεδομένα μεθυλίωσης του DNA ελήφθησαν από τη βάση TCGA (<http://tcga-data.nci.nih.gov>) για (A) αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου - COAD (258 δείγματα όγκου και 38 φυσιολογικά δείγματα).

Οι Muzny et al. (2012) σε αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου και καρκίνωμα πλακωδών κυττάρων κεφαλής και λαιμού παρατήρησαν ότι οι περιοχές CpG που εμφάνισαν παρεκκλίσεις της κατηγορίας I στα T-iPSCs εντοπίστηκαν επίσης ( $P < 0,05$ ) μεταξύ των παρεκκλίσεων της κατηγορίας I στο αδενοκαρκίνωμα του παχέος εντέρου και στο καρκίνωμα πλακωδών κυττάρων κεφαλής και λαιμού (Εικόνα 12B). Ωστόσο, δεν είναι προφανές εάν τα γονίδια που υπάρχουν εντός των περιοχών κοντά στις παρεκκλίσεις της κατηγορίας I που μοιράζονται μεταξύ των T-iPSCs και των 2 τύπων καρκίνου παίζουν λειτουργικό ρόλο ή έχουν χαρακτηριστικά που θα τα καθιστούσαν ευαίσθητα σε παρεκκλίνουσα μεθυλίωση.



Εικόνα 12B: Διαφορά μεθυλίωσης του DNA μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών ιστών σε κάθε θέση CpG που αναγνωρίζεται με παρεκκλίνουσα μεθυλίωση στα Y-iPSCs (αριστερό γράφημα) ή στα T-iPSCs (δεξιό γράφημα). Τα δεδομένα μεθυλίωσης του DNA ελήφθησαν από τη βάση TCGA (<http://tcga-data.nci.nih.gov>) για (B) πλακώδες κυτταρικό καρκίνωμα κεφαλής και λαιμού - HNSC (310 δείγματα όγκων και 50 φυσιολογικά δείγματα).



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

### 3.1 Μέθοδος για τον επαναπρογραμματισμό σε καρδιακά μυοκύτταρα (iCMs)

Η καρδιά αποτελείται στην πλειοψηφία της από καρδιομυοκύτταρα, τα οποία εκτελούν τις ρυθμικές συσπάσεις και από καρδιακούς ινοβλάστες. Επειδή τα καρδιομυοκύτταρα χαρακτηρίζονται από περιορισμένη ικανότητα αναγέννησης, σε περίπτωση καταστροφής τους αναπληρώνονται από τους ινοβλάστες. Ωστόσο, οι ινοβλάστες δεν έχουν την ικανότητα σύσπασης των καρδιομυοκυττάρων και εν τέλει η καρδιά δυσλειτουργεί.

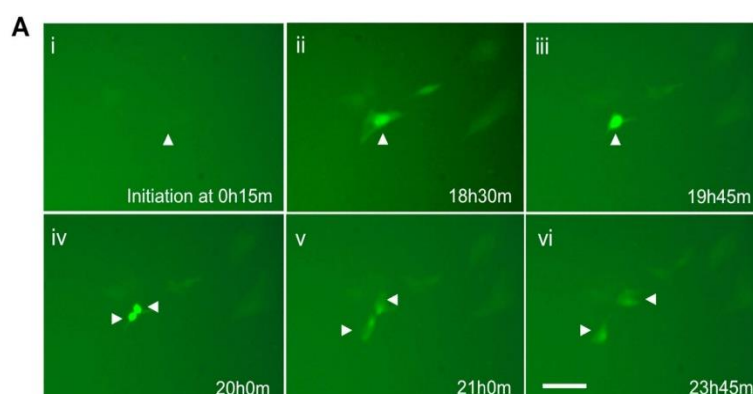
Πρόσφατες μελέτες έχουν αποδείξει τον επαναπρογραμματισμό των ινοβλαστών σε καρδιομυοκύτταρα (induced cardiomyocytes ή iCMs) μέσω της έκθεσής τους σε ειδικούς μεταγραφικούς παράγοντες. Η προσέγγιση αυτή αποτελεί το μέλλον της αναγεννητικής ιατρικής και έχει μελετηθεί εκτενώς (Efe et al. 2011) (Epstein 2010) .

Έχει δειχθεί ότι αρχικά, οι ινοβλάστες εξέρχονται από τον κυτταρικό κύκλο κατά τη διάρκεια του επαναπρογραμματισμού τους σε καρδιομυοκύτταρα (Bektik et al. 2018). Στη συνέχεια, κάθε φάση του κυτταρικού κύκλου χαρακτηρίζεται από μια συγκεκριμένη μορφή χρωματίνης, που μπορεί να είναι δεκτική ή όχι στον επαναπρογραμματισμό. Μελέτες με διαγονιδιακούς εμβρυονικούς ινοβλάστες ποντικού (mouse embryonic fibroblasts ή MEFs) για τη μελέτη του επαναπρογραμματισμού έδειξαν ότι το γονίδιο GFP εκφράζεται μόνο όταν ενεργοποιηθεί ο υποκινητής της βαριάς αλυσίδας της α-μυοσίνης (α-myosin heavy chain ή αMHC). Επειδή ο υποκινητής αυτός ενεργοποιείται στα καρδιομυοκύτταρα, η ανίχνευση φθορισμού υποδεικνύει την έναρξη του επαναπρογραμματισμού των ινοβλαστών σε καρδιομυοκύτταρα (Bektik et al. 2018) (Ieda et al. 2010).

Στην αρχή, οι επιστήμονες μόλυναν τους διαγονιδιακούς εμβρυονικούς ινοβλάστες ποντικού (transgenic mouse embryonic fibroblasts ή MEFs) με ένα μίγμα από μονοκιστρονικούς ρετροϊούς. Οι ιοί αυτοί φέρουν τα διαγονίδια Gata4, Mef2c και Tbx5 (GMT) (Bektik et al. 2018) (Efe et al. 2011). Τα GMT κωδικοποιούν για μεταγραφικούς παράγοντες που είναι απαραίτητοι για τον επαναπρογραμματισμό των διαγονιδιακών ινοβλαστών ποντικού (MEFs) σε επαγόμενα καρδιακά μυοκύτταρα (induced cardiomyocytes). Οι μεταγραφικοί αυτοί παράγοντες (GMT) εκφράζονται φυσιολογικά στην καρδιά. Ειδικότερα, οι ερευνητές παρατήρησαν πως από τη δεύτερη ημέρα μετά τη μόλυνση από τους μονοκιστρονικούς ρετροϊούς (DPI – 2) φαίνεται ένα αχνό σήμα της φθορίζουσας πρωτεΐνης GFP. Οπότε, κατέληξαν στο συμπέρασμα πως έχει ξεκινήσει ο επαναπρογραμματισμός των διαγονιδιακών ινοβλαστών ποντικού (transgenic mouse embryonic fibroblasts ή MEFs) τη δεύτερη ημέρα μετά τη μόλυνση από τους μονοκιστρονικούς ρετροϊούς (DPI – 2). Επιπλέον, παρατήρησαν

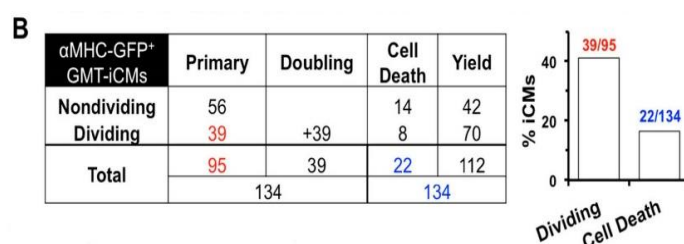


πως το κύτταρο αυτό, παρόλο που έχει ξεκινήσει ο επαναπρογραμματισμός του, υφίσταται κυτταρική διαίρεση, όπως φαίνεται στην Εικόνα 13A (Bektik et al. 2018).



**Εικόνα 13A:** Αντιπροσωπευτικές εικόνες μιας εγγραφής χρονικού διαστήματος του επαναπρογραμματισμού GMT που δείχνει ότι ένα κύριο iCM (βέλος) διαιρείται σε δύο θυγατρικά iCMs 20.75 ώρες μετά την ενεργοποίηση του aMHC-GFP.

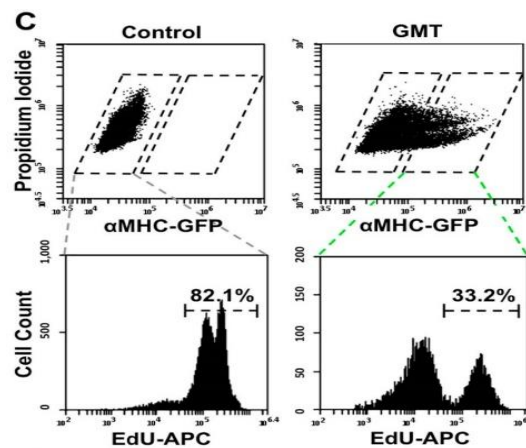
Ειδικότερα, καταμέτρησαν τους ακριβείς αριθμούς κυττάρων και κατέληξαν πως τα 39 / 95 πρωταρχικά κύτταρα ( ~ 41 % ) πραγματοποίησαν κυτταρική διαίρεση μέσα σε 48 ώρες και τα 22 / 134 πέθαναν πριν ή μετά την κυτταρική διαίρεση τους, όπως φαίνεται στην Εικόνα 13B. Οπότε, αξίζει να υπογραμμιστεί πως, στα πρώτα στάδια του επαναπρογραμματισμού των iCMs υπάρχουν κύτταρα που υφίστανται κυτταρική διαίρεση (Bektik et al. 2018).



**Εικόνα 13B:** Ένας πίνακας που συνοψίζει τα αποτελέσματα των GMT-iCMs των τριών παρτίδων. Χρησιμοποιήθηκαν οι αριθμοί με κόκκινο χρώμα για να υπολογιστεί το ποσοστό της διαίρεσης των πρωτογενών iCMs και οι αριθμοί με μπλε χρώμα για το ποσοστό κυτταρικού θανάτου μεταξύ των συνολικών iCMs, οι οποίοι συνοψίστηκαν στο γράφημα.

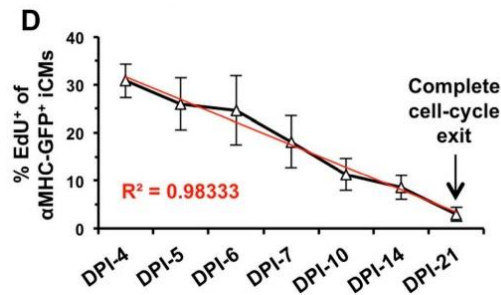
Συμπαίραναν επομένως ότι τα iCMs υφίστανται κυτταρική διαίρεση και εξέρχονται από τον κυτταρικό κύκλο μαζί με την πρόοδο του επαναπρογραμματισμού.

Στη συνέχεια, οι Bektik et al. 2018 εφάρμοσαν τη μέθοδο EdU assay (5 – ethynyl – 2 – deoxyuridine). Στόχος ήταν να ποσοτικοποιηθεί η κυτταρική διαίρεση των iCMs (induced cardio – myocytes), δηλαδή των επαγόμενων καρδιακών μυοκυττάρων. Το EdU είναι ανάλογο της θυμιδίνης και προστίθεται στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα του DNA. Πάνω σε αυτό συνδέεται ένα αντίσωμα anti - EdU που φέρει ένα φθορίζον μόριο (APC). Οπότε, τα νέα κύτταρα που προέκυψαν, ύστερα από την κυτταρική διαίρεση, έχουν το επιπλέον χαρακτηριστικό πως φθορίζουν. Η επώαση με το EdU διήρκεσε 24 ώρες. Μετά το πέρας αυτών των ωρών, παρατηρήθηκε πως το 82,1% των διαγονιδιακών ινοβλαστών ποντικού (transgenic mouse embryonic fibroblasts ή MEFs) , οι οποίοι δεν είχαν μολυνθεί από το μίγμα με τους μονοκιστρικούς ρετροϊούς, πραγματοποίησαν κυτταρική διαίρεση. Σε αντίθεση, το 33,2% των iCMs (induced cardio – myocytes), δηλαδή των επαγόμενων καρδιακών μυοκυττάρων, την τέταρτη ημέρα μετά τη μόλυνση, DPI - 4, πραγματοποίησαν κυτταρική διαίρεση, όπως φαίνεται στην Εικόνα 13C. Τα ακόλουθα διαγράμματα FACS προέκυψαν από κυτταρομετρία ροής (Bektik et al. 2018).



**Εικόνα 13C:** Αντιπροσωπευτικά διαγράμματα FACS των αMHC-GFP<sup>+</sup> iCMs (άνω πλαίσια) και δοκιμασία EdU 24 ωρών επώασης που εκτιμά την κυτταρική διαίρεση των εμβρυϊκών ινοβλαστών ποντικού (MEFs) (κάτω αριστερά πλαίσια) και αMHC-GFP<sup>+</sup> iCMs 4 ημέρες μετά τη μόλυνση.

Στη συνέχεια παρατήρησαν πως το ποσοστό των διαιρούμενων κυττάρων iCMs σταδιακά μειώθηκε από την τέταρτη ημέρα μετά τη μόλυνση (DPI – 4) έως την εικοστή πρώτη ημέρα μετά τη μόλυνση (DPI – 21). Ειδικότερα, σχεδόν κανένα iCM την εικοστή πρώτη ημέρα μετά τη μόλυνση (DPI – 21) δεν ήταν θετικό στην EdU assay (EdU+). Οπότε, οι ερευνητές συμπέραναν πως όλα τα iCMs εξήλθαν από τον κυτταρικό κύκλο - επαναπρογραμματίστηκαν μέχρι και την εικοστή πρώτη ημέρα μετά τη μόλυνση (DPI – 21), όπως φαίνεται στην Εικόνα 13D (Bektik et al. 2018).

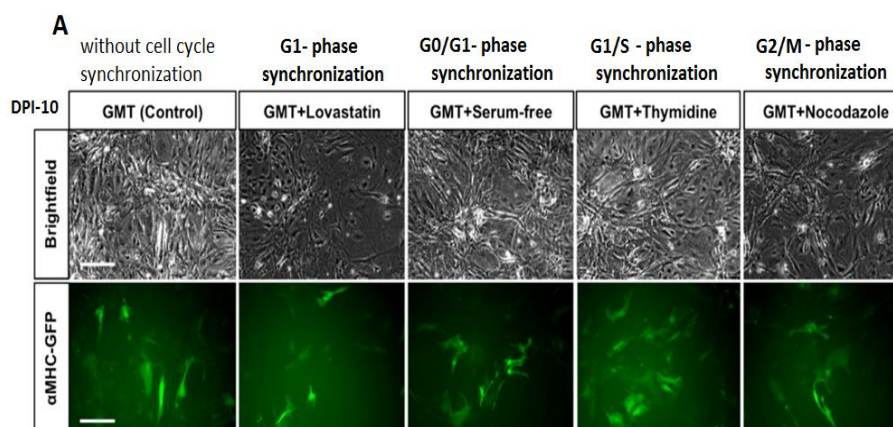


Εικόνα 13D: Η εκατοστιαία αναλογία διαιρέσεως των EdU<sup>+</sup> / aMHC-GFP<sup>+</sup> GMT-iCMs από DPI-4 έως DPI-21 (n = 5).

### 3.2 Επίδραση του συγχρονισμού σε μία φάση του κυτταρικού κύκλου για την πρόοδο του επαναπρογραμματισμού των iCMs

Οι ερευνητές αναρωτήθηκαν εάν ο συγχρονισμός των GMT-iCMs (των επαναπρογραμματισμένων κυττάρων με τους GMT παράγοντες) σε μία συγκεκριμένη φάση του κυτταρικού κύκλου θα μπορούσε να βελτιώσει την απόδοση του επαναπρογραμματισμού, εφόσον η δομή της χρωματίνης μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Η διαδικασία του συγχρονισμού σε μια φάση, έστω φάση γ, περιλαμβάνει την εφαρμογή κάποιων συνθηκών με τις οποίες τα κύτταρα που βρίσκονται εκείνη τη στιγμή (φάση γ) παραμένουν σε αυτήν και δεν μπορούν να προχωρήσουν παραπέρα, μέχρι να φτάσουν και τα υπόλοιπα στη αυτή, έτσι ώστε με την αφαίρεση των συνθηκών να ξεκινήσουν όλα από μια κοινή αφετηρία, τη φάση γ (Efe et al. 2011).

Την πρώτη ημέρα μετά τη μόλυνση των ινοβλαστών (DPI-1) με τους παράγοντες επαναπρογραμματισμού GMT ακολούθησε 24ωρη επώασή τους με lovastatin, θρεπτικό μέσο χωρίς ορό, θυμιδίνη και nocodazole για το συγχρονισμό στις φάσεις G1, G0/G1, G1/S και G2/M αντίστοιχα. Στην Εικόνα 14Α φαίνεται το αποτέλεσμα των επώάσεων δέκα ημέρες μετά τη μόλυνση. Παρατηρήθηκε μια αύξηση του αριθμού των φθορίζοντων κυττάρων, δηλαδή αυτών που επαναπρογραμματίστηκαν, μετά από συγχρονισμό στο όριο μεταξύ G1/S, σε σχέση με την ομάδα control, στην οποία δεν έγινε συγχρονισμός (Bektik et al. 2018) (Ieda et al. 2010).



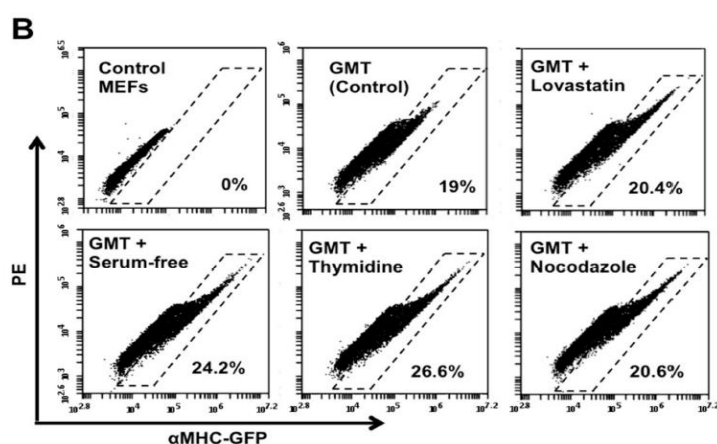
**Εικόνα 14A:** Αντιπροσωπευτικές εικόνες μικροσκοπίας που δείχνουν τους επαναπρογραμματισμένους ινοβλάστες την δέκατη ημέρα μετά την μόλυνση με ή χωρίς συγχρονισμό.

Ακολούθησε ανοσοχρώση με δύο αντισώματα έναντι του GFP, ένα που είναι σημασμένο με το φθοροφόρο PE (phycoerythrin) και ένα δεύτερο με το φθοροφόρο FITC (fluorescein isothiocyanate), και στη συνέχεια κυτταρομετρία ροής. Τα FACS διαγράμματα (Εικόνα 14B) και τα γραφήματα στηλών (Εικόνα 14C) απεικονίζουν τα αποτελέσματα τη δέκατη ημέρα μετά τη μόλυνση.

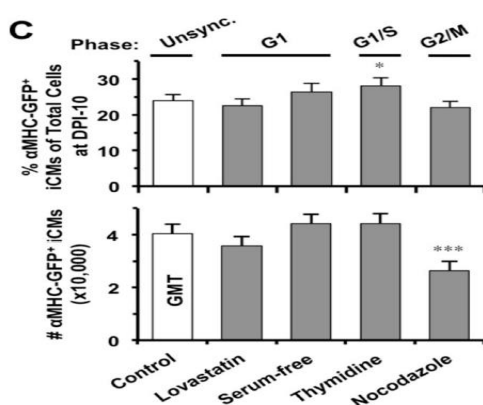
- Οι βούλες μέσα στο παραλληλόγραμμο με τις διακεκομμένες γραμμές αντιστοιχούν στα κύτταρα που επαναπρογραμματίστηκαν (έχουν δώσει θετικό αποτέλεσμα και για τους δύο τρόπους ανίχνευσης και επιβεβαίωσης φθορισμού που φαίνονται στους κάθετους άξονες).
- Το πρώτο διάγραμμα FACS (control MEFs) αντιστοιχεί στους ινοβλάστες που δεν επαναπρογραμματίστηκαν και επομένως κανένας δε φθορίζει.
- Το δεύτερο διάγραμμα FACS (GMT control) αντιστοιχεί στους επαναπρογραμματισμένους αλλά ασυγχρόνιστους ινοβλάστες.
- Τα υπόλοιπα FACS αντιστοιχούν στο συγχρονισμό των κυττάρων στις διάφορες φάσεις.
- Το επάνω διάγραμμα της Εικόνας 14C αντιστοιχεί στο ποσοστό των επαναπρογραμματισμένων κυττάρων, ενώ το κάτω στον απόλυτο αριθμό αυτών.

Μελετώντας τα συγκεκριμένα διαγράμματα οι Bektik et al. 2018 κατέγραψαν τις εξής παρατηρήσεις:

- Παίρνοντας υπόψιν το FACS διάγραμμα GMT+Thymidine (Εικόνα 14B) και το πάνω γράφημα στηλών (Εικόνα 14C) φαίνεται ότι ο συγχρονισμός στο όριο φάσεων G1/S αυξάνει το ποσοστό των επαναπρογραμματισμένων MHC-GFP+ iCMs.
- Παρατηρώντας το κάτω γράφημα στηλών (Εικόνα 14C) με τους απόλυτους αριθμούς φαίνεται ότι ο απόλυτος αριθμός των επαναπρογραμματισμένων MHC-GFP+ iCMs κατά το συγχρονισμό στο όριο φάσεων G1/S δεν αυξήθηκε σημαντικά, ενώ μάλιστα μειώθηκε αρκετά κατά το συγχρονισμό στο όριο φάσεων G2/M (nocodazole).

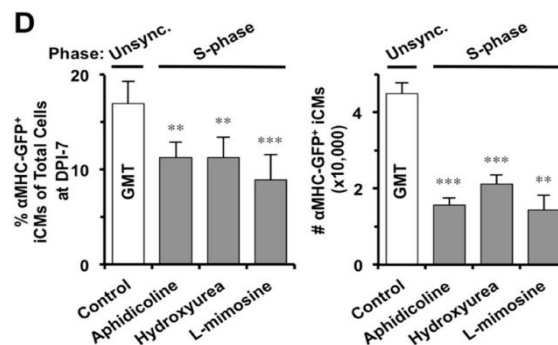


Εικόνα 14B: Διαγράμματα FACS επαναπρογραμματισμένων ινοβλαστών την δέκατη ημέρα μετά τη μόλυνση (DPI-10). Κάθε κουκίδα αντιπροσωπεύει ένα κύτταρο.



Εικόνα 14C: Η επίδραση του συγχρονισμού στις διάφορες φάσεις στον αριθμό των επαναπρογραμματισμένων κυττάρων, συμπεριλαμβανομένου του ποσοστού (πάνω διάγραμμα) και του απόλυτου αριθμού (κάτω διάγραμμα) τη δέκατη ημέρα μετά τη μόλυνση (DPI-10).

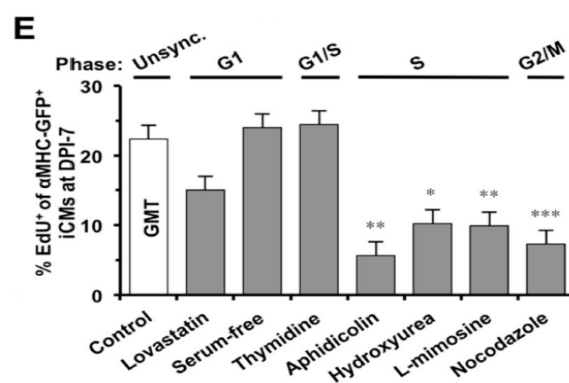
Στη συνέχεια μελέτησαν την επίδραση του συγχρονισμού στη φάση S στην απόδοση του επαναπρογραμματισμού χρησιμοποιώντας τις ουσίες aphidicolin, hydroxyurea και L-mimosine. Στην Εικόνα 14D φαίνονται τα αποτελέσματα την έβδομη ημέρα μετά την μόλυνση.



Εικόνα 14D: Η επίδραση του συγχρονισμού στη φάση S από τις ουσίες aphidicolin, hydroxyurea, ή L-mimosine στον αριθμό των επαναπρογραμματισμένων κυττάρων την έβδομη ημέρα μετά τη μόλυνση.

Παρατηρήθηκε ότι ο συγχρονισμός στη φάση S (και από τις 3 ουσίες) μείωσε σημαντικά τον αριθμό (ποσοστό και απόλυτο) των επαναπρογραμματισμένων MHC-GFP<sup>+</sup> iCMs.

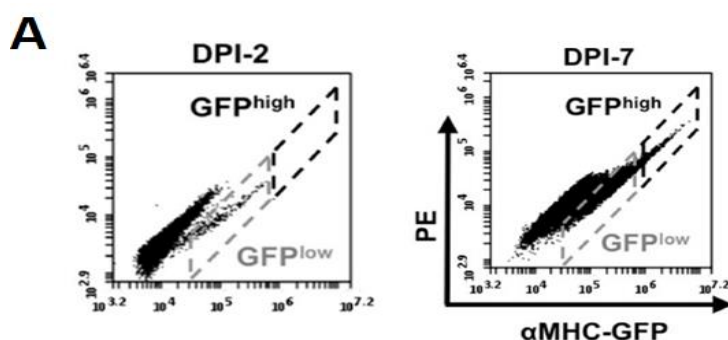
Ωστόσο, όταν ακολούθησε Edu assay για την ποσοτικοποίηση των διαιρούμενων κυττάρων βρέθηκε ότι ο συγχρονισμός στη φάση S και G2/M μείωσε σημαντικά το ποσοστό των διαιρούμενων επαναπρογραμματισμένων MHC-GFP<sup>+</sup> iCMs (Εικόνα 14E) (Bektik et al. 2018).



Εικόνα 14E: Το ποσοστό των διαιρούμενων κυττάρων (EdU<sup>+</sup>) από το συνολικό αριθμό των επαναπρογραμματισμένων την έβδομη ημέρα μετά τη μόλυνση (DPI-7).

Επομένως φάνηκε ότι ο συγχρονισμός στη φάση S ή στο όριο G2/M μπορεί να μειώνει το συνολικό αριθμό κυττάρων που επαναπρογραμματίζονται, αλλά αυξάνει τον αριθμό αυτών που θα βγουν από τον κυτταρικό κύκλο.

Στην συνέχεια, πραγματοποίησαν κυτταρομετρία ροής με σκοπό να μετρήσουν τα επίπεδα έκφρασης του GFP στα επαναπρογραμματισμένα κύτταρα. Για να πετύχουν το σκοπό αυτό χρησιμοποίησαν δύο αντισώματα για το GFP, ένα που είναι σημασμένο με το φθοροφόρο PE και ένα δεύτερο με το φθοροφόρο FITC (Εικόνα 15A). Από τα δεδομένα των διαγραμμάτων κυτταρομετρίας ροής κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι ο φθορισμός των κυττάρων ποικίλει από κύτταρο σε κύτταρο και στις διαφορετικές μέρες μετά την μόλυνση με ρετροϊό, το οποίο υποδεικνύει ότι τα κύτταρα βρίσκονται σε διαφορετικά στάδια του επαναπρογραμματισμού. Επίσης, έγινε εμφανές ότι τα επαναπρογραμματισμένα κύτταρα σχηματίζουν δύο μεγάλες ομάδες, τα κύτταρα που έχουν υψηλή έκφραση του GFP και τα κύτταρα που έχουν χαμηλή έκφραση του GFP (Bektik et al. 2018) (Ieda et al. 2010).

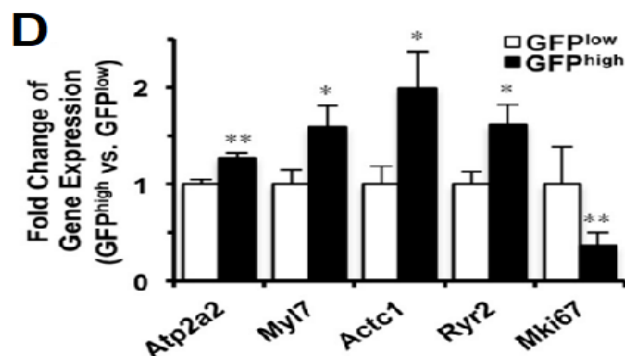


Εικόνα 15A: Αποτελέσματα κυτταρομετρίας ροής. Άξονας y'y: φθορισμός PE, άξονας x'x: φθορισμός FITC. Κάθε κουκίδα αντιπροσωπεύει ένα κύτταρο- ένα γεγονός.

Ακολούθως, μελέτησαν την έκφραση έξι καρδιακών δεικτών και ενός δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού στα επαναπρογραμματισμένα κύτταρα που ανήκουν στις δύο μεγάλες ομάδες που προαναφέρονται. (Εικόνα 15D). Από τα αποτελέσματα του ραβδογράμματος γίνεται κατανοητό ότι τα κύτταρα που ανήκουν στην ομάδα των κυττάρων με υψηλή έκφραση GFP εκφράζουν τους έξι καρδιακούς δείκτες σε υψηλότερο επίπεδο σε σχέση με τα κύτταρα με χαμηλή έκφραση GFP. Αντιθέτως, τα ίδια κύτταρα εκφράζουν σε χαμηλότερο επίπεδο το δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε σχέση με τα κύτταρα με χαμηλή έκφραση GFP. Το γεγονός αυτό είναι λογικό καθώς τα κύτταρα με υψηλή έκφραση GFP βρίσκονται σε

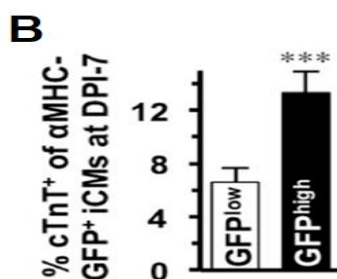


μεταγενέστερο στάδιο του επαναπρογραμματισμού, προσομοιάζουν τα καρδιομυοκύτταρα (Bektik et al. 2018) (Efe et al. 2011).



**Εικόνα 15D:** Επίπεδο έκφρασης των δεικτών Atp2a2, Myl7, Actc1, Ryr2, Mki67 στους δύο πληθυσμούς κυττάρων GFP<sup>high</sup> και GFP<sup>low</sup>.

Η καρδιακή τροπονίνη είναι μία πρωτεΐνη που παράγεται μόνο στα καρδιομυοκύτταρα. Για τον λόγο αυτό διερευνήθηκε η έκφρασή της στα επαναπρογραμματισμένα κύτταρα με κυτταρομετρία ροής με αντίσωμα που φέρει το φθοροφόρο APC για την καρδιακή τροπονίνη (Εικόνα 15B). Διαπιστώθηκε ότι μεγαλύτερο ποσοστό των επαναπρογραμματισμένων κυττάρων που έχουν υψηλή έκφραση του GFP παράγουν την καρδιακή τροπονίνη (Bektik et al. 2018) (Efe et al. 2011).

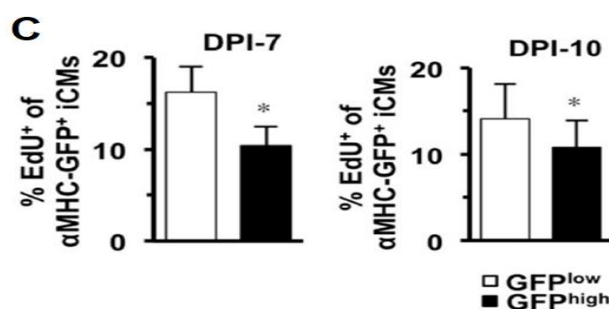


**Εικόνα 15B:** Άξονας y'y: ποσοστό των επαναπρογραμματισμένων κυττάρων που εκφράζουν καρδιακή τροπονίνη την έβδομη ημέρα μετά την μόλυνση (DPI-7).

Με δεδομένο ότι τα πλήρως διαφοροποιημένα καρδιομυοκύτταρα παύουν να διαιρούνται, εξετάστηκε τι ποσοστό των επαναπρογραμματισμένων κυττάρων συνεχίζει να διαιρείται. Τα

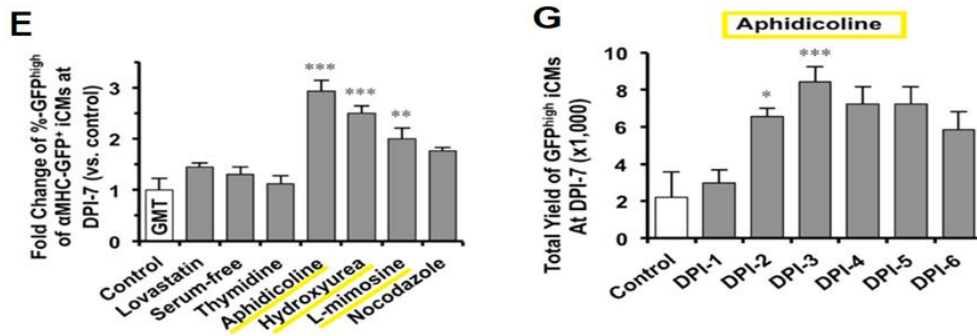


κύτταρα εμβαπτίσθηκαν σε διάλυμα με EdU, το οποίο είναι ανάλογο θυμιδίνης και προστίθεται στις νεοσυντιθέμενες αλυσίδες του DNA (κατά την αντιγραφή) και στη συνέχεια έγινε χρήση φθορίζοντος ισοθεικυανικού αντισώματος για την ανίχνευση του EdU (Εικόνα 15C). Διαπιστώθηκε ότι τόσο την έβδομη όσο και την δέκατη ημέρα μετά την μόλυνση, μεγαλύτερο ποσοστό των επαναπρογραμματισμένων κυττάρων που έχουν χαμηλή έκφραση GFP συνεχίζουν να διαιρούνται (Bektik et al. 2018) (Ieda et al. 2010).



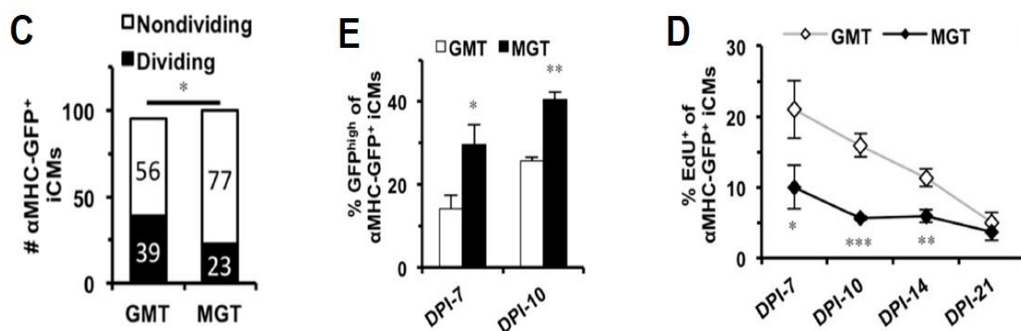
Εικόνα 15C: Ποσοστό των επαναπρογραμματισμένων κυττάρων που διαιρούνται (EdU+) στους δύο πληθυσμούς κυττάρων GFP<sup>high</sup> και GFP<sup>low</sup>.

Στη συνέχεια ακολούθησε συγχρονισμός των κυττάρων στις διαφορετικές φάσεις του κυτταρικού κύκλου χρησιμοποιώντας τις αντίστοιχες ενώσεις. Όπως προαναφέρθηκε, τα διαλύματα Iovastatin και θρεπτικό μέσο με έλλειψη ορού συγχρονίζουν τα κύτταρα στη φάση G1, οι ενώσεις θυμιδίνη και L-mimosine συγχρονίζουν τα κύτταρα στο όριο μεταξύ των φάσεων G1/S, οι ενώσεις aphidicoline και hydroxyurea συγχρονίζουν τα κύτταρα στην φάση S και τέλος η ένωση nocodazole συγχρονίζει τα κύτταρα στο όριο μεταξύ των φάσεων G2/M (Εικόνα 15E και G). Παρατηρήθηκε αύξηση του ποσοστού των επαναπρογραμματισμένων κυττάρων με υψηλή έκφραση GFP όταν τα κύτταρα συγχρονιστούν στη φάση S του κυτταρικού κύκλου (με την χρήση των ενώσεων aphidicoline, hydroxyurea και L- mimosine) (Εικόνα 15E). Στη συνέχεια, μετά από χορήγηση aphidicoline για να συγχρονισθούν τα κύτταρα σε διαφορετικές ημέρες (από την πρώτη μέχρι την έκτη ημέρα) μετά την μόλυνση με ρετροϊό παρατηρήθηκε ότι ο συγχρονισμός στην φάση S αυξάνει τον αριθμό των κυττάρων με υψηλή έκφραση GFP χωρίς όμως να αυξάνει τον συνολικό αριθμό των επαναπρογραμματισμένων κυττάρων (GFP<sup>+</sup>) ενώ παράλληλα επιταχύνει την έναρξη του επαναπρογραμματισμού (Εικόνα 15G) (Bektik et al. 2018) (Ieda et al. 2010).



**Εικόνα 15E,G:** Άξονας y'y: ποσοστό των επαναπρογραμματισμένων κυττάρων που εμφανίζουν υψηλό επίπεδο έκφρασης GFP, άξονας x'x: ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τον συγχρονισμό των κυττάρων στις διαφορετικές φάσεις του κυτταρικού κύκλου / άξονας y'y: ο συνολικός αριθμός των επαγόμενων καρδιομυοκυττάρων που έχουν υψηλή έκφραση GFP την έβδομη ημέρα μετά την μόλυνση (DPI-7), άξονας x'x: ημέρες που πραγματοποιήθηκε ο συγχρονισμός.

Στη συνέχεια έγινε σύγκριση των ιδιοτήτων της μονοκυστρονικής (MGT) και της πολυκυστρονικής (GMT) κατασκευής που χρησιμοποιήθηκαν για την μόλυνση των επαγόμενων καρδιομυοκυττάρων (Εικόνα 16C,E,D). Παρατηρήθηκε ότι λιγότερα κύτταρα, τα οποία περιέχουν την πολυκυστρονική κατασκευή, συνέχιζαν να διαιρούνται (Εικόνα 16C). και ότι μεγαλύτερο ποσοστό των επαναπρογραμματισμένων κυττάρων με την πολυκυστρονική κατασκευή εκφράζουν GFP σε υψηλό επίπεδο σε σχέση με τα κύτταρα με την μονοκυστρονική κατασκευή (Εικόνα 16E) (Bektik et al. 2018). Τέλος, οι ερευνητές πραγματοποίησαν μία ακόμα δοκιμασία EdU, ώστε να εντοπιστούν τα κύτταρα που διαιρούνται από την έβδομη μέχρι την εικοστή πρώτη ημέρα μετά την μόλυνση (Εικόνα 16D) και διαπιστώθηκε ότι μικρότερο ποσοστό των επαναπρογραμματισμένων κυττάρων που έχουν λάβει την πολυκυστρονική κατασκευή συνεχίζουν να διαιρούνται το διάστημα των δύο αυτών εβδομάδων (Bektik et al. 2018).



Εικόνα 16C.E.D: Άξονας y'y: απόλυτη τιμή των επαναπρογραμματισμένων κυττάρων, άξονας x'x: κύτταρα με την μονοκυστρωνική ή την πολυκυστρωνική κατασκευή / άξονας y'y: ποσοστό των επαναπρογραμματισμένων κυττάρων με υψηλή έκφραση GFP, άξονας x'x: κύτταρα με την μονοκυστρωνική ή την πολυκυστρωνική κατασκευή / άξονας y'y: ποσοστό των επαναπρογραμματισμένων κυττάρων που είναι θετικά για την δοκιμασία EdU, άξονας x'x: ημέρες μετά την μόλυνση με ρετροϊό.

Τα συμπεράσματα της μελέτης έδειξαν ότι τα επαγόμενα καρδιομυοκύτταρα διαιρούνται τουλάχιστον μία φορά στα πρώιμα στάδια του επαναπρογραμματισμού. Δεύτερον, η έξοδος των επαγόμενων καρδιομυοκυττάρων από τον κυτταρικό κύκλο αποτελεί στάδιο του επαναπρογραμματισμού. Τρίτον, ο συγχρονισμός των κυττάρων στην φάση S προωθεί την έξοδο από τον κυτταρικό κύκλο, άρα και τον επαναπρογραμματισμό. Τέλος, επισημαίνουν ότι η έρευνα πρέπει να στραφεί προς την μελέτη των επιγενετικών αλλαγών που συμβαίνουν στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου, καθώς φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην έναρξη και στην ολοκλήρωση του επαναπρογραμματισμού (Bektik et al. 2018) (Efe et al. 2011) (Ieda et al. 2010) (Narazaki et al. 2008).

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παραγωγή των iPSCs έχει προσφέρει στους ερευνητές ένα μοναδικό εργαλείο για τη μελέτη των μηχανισμών του κυτταρικού επαναπρογραμματισμού. Είναι σαφές ότι για την απόκτηση της ολοδυναμίας, τα επαναπρογραμματισμένα κύτταρα πρέπει να "σβήσουν" τα επιγενετικά σημάδια της διαφοροποίησης για να επιστρέψουν στην κατάσταση που καθορίζει την ολοδύναμη κατάσταση των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων. Ωστόσο, πολλά iPSCs που πληρούν τα αυστηρά κριτήρια για την απόκτηση της ολοδυναμίας εξακολουθούν να έχουν μη τυχαίες διαφορές στη μεθυλίωση του DNA τους σε σύγκριση με τα ESCs, οι οποίες συνεχίζουν να υφίστανται κατά τα περάσματα του κυτταρικού κύκλου και τη διαφοροποίηση. Η ελλιπής διαγραφή των σημείων μεθυλίωσης του DNA κατά τον επαναπρογραμματισμό των σωματικών κυττάρων σε ολοδύναμα βλαστικά κύτταρα εξηγεί τις φαινοτυπικές τους διαφορές, καθώς υπάρχει υψηλότερη τάση των iPSCs να διαφοροποιούνται στη γενεαλογία των κυττάρων από την οποία προέρχονται, ένα φαινόμενο που αναφέρεται ως επιγενετική μνήμη.

Επιπρόσθετα, η παραγωγή των iPSCs επηρέασε την άποψη των ερευνητών για την ανάπτυξη. Χρειάζονται μόνο μερικοί μεταγραφικοί παράγοντες για να αλλάξουν ισχυρά την τύχη των

κυττάρων. Υπάρχουν iPSCs που παράχθηκαν από έναν κοινό γονεϊκό τύπο κυττάρου, τα οποία εμφανίζουν ξεχωριστές παρεκκλίσεις μεθυλίωσης του DNA στο επιγένωμα τους ανάλογα με το σύνολο των παραγόντων επαναπρογραμματισμού που χρησιμοποιήθηκε. Ειδικότερα, οι παρεκκλίσεις της μεθυλίωσης του DNA κυριαρχούνται από υπομεθυλίωση. Ωστόσο, έχει διαπιστωθεί ότι ένα σημαντικό ποσοστό των iPSCs είναι επίσης υπερμεθυλιωμένα σε σύγκριση με τα ESCs. Συνολικά, ωστόσο, βρέθηκαν πολύ λίγες περιπτώσεις παρεκκλίσεων de novo μεθυλίωσης ή απομεθυλίωσης στα iPSCs. Η συντριπτική πλειονότητα των παρεκκλίσεων μεθυλίωσης πιθανόν είναι αποτέλεσμα αποτυχίας μεθυλίωσης και απομεθυλίωσης σε διάφορες θέσεις εντός του γονεϊκού επιγενώματος κατά τον επαναπρογραμματισμό.

Αξίζει να σημειωθεί ότι οι κατηγορίες των παρεκκλίσεων της μεθυλίωσης του DNA στα Y-iPSCs και T-iPSCs διαφέρουν σημαντικά. Οι ειδικές παρεκκλίσεις της μεθυλίωσης του DNA για τα Y-iPSCs χαρακτηρίζονται κυρίως από αποτυχία απομεθυλίωσης, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι κυτταρικές αλλαγές που οφείλονται στους παράγοντες Yamanaka κατά τον επαναπρογραμματισμό οδηγούν σε ανεπάρκεια απομεθυλίωσης. Αντίθετα, οι ειδικές παρεκκλίσεις της μεθυλίωσης του DNA στα T-iPSCs χαρακτηρίζονται κυρίως από αποτυχία μεθυλίωσης του DNA, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι κυτταρικές αλλαγές που οφείλονται στους παράγοντες Thomson κατά τον επαναπρογραμματισμό οδηγούν σε ανεπαρκή μεθυλίωση του DNA. Καθώς η σίγαση των γονιδίων της διαφοροποίησης σε σωματικά κύτταρα είναι απαραίτητη για την επίτευξη της ολοδύναμης κατάστασης, η ανεπαρκής δραστηριότητα της μεθυλίωσης που καθοδηγείται από τους παράγοντες Thomson, σε σύγκριση με τους παράγοντες Yamanaka, μπορεί να εξηγήσει τη χαμηλότερη αποτελεσματικότητα επαναπρογραμματισμού τους από ό,τι όταν χρησιμοποιούνται οι παράγοντες Yamanaka. Δεδομένου ότι τα T-iPSCs υπομεθυλιώνονται σε σχέση με τα ESCs και τα Y-iPSCs είναι υπερμεθυλιωμένα σε σχέση με τα ESCs, προτείνεται ότι ισχύει ότι η επιγενετική μνήμη των iPSCs να διαφοροποιηθούν σε γονεϊκή γενεαλογία, η οποία προκύπτει λόγω της ατελούς σίγασης των σωματικών γονιδίων, μπορεί να είναι υψηλότερη στα T-iPSCs απ' ό,τι στα Y-iPSCs.

Επιπλέον, οι διαφορές στη δραστηριότητα της μεθυλίωσης και της απομεθυλίωσης κατά τον επαναπρογραμματισμό με τους παράγοντες επαναπρογραμματισμού των Yamanaka και Thomson μπορούν να παρέχουν μια λογική για την επιλογή παραγόντων επαναπρογραμματισμού και για την επιλογή επιγενετικών φαρμάκων που βελτιώνουν την αποδοτικότητα. Συγκεκριμένα, οι παράγοντες Thomson μπορεί να είναι καλύτεροι στον επαναπρογραμματισμό τύπων κυττάρων που έχουν πολύ μεθυλιωμένα γονιδιώματα, ενώ οι

παράγοντες Yamanaka μπορεί να είναι καταλληλότεροι για τον επαναπρογραμματισμό σωματικών κυττάρων που έχουν μεγάλο ποσοστό ανοιχτής χρωματίνης που πρέπει να σιγήσει κατά τον επαναπρογραμματισμό. Θεωρείται ότι τα αντιδραστήρια που ενισχύουν την απομεθυλίωση του DNA μπορεί να αποδειχθούν πιο χρήσιμα στην αντιμετώπιση των αποτυχημένων παρεκκλίσεων απομεθυλίωσης του DNA στον επαναπρογραμματισμό των Y-iPSCs παρά στον επαναπρογραμματισμό των T-iPSCs, καθώς τα τελευταία είναι πιο αποτελεσματικά στην πρόκληση απομεθυλίωσης του DNA.

Ακόμη, η απομόνωση των iPSCs προκάλεσε το ενδιαφέρον για τον επαναπρογραμματισμό ενός κυτταρικού τύπου σε κάποιον άλλον, γεγονός το οποίο έχει οδηγήσει σε μια σειρά από αξιοσημείωτες εφαρμογές σε παγκρεατικούς, καρδιακούς, ηπατικούς και νευρικούς κυτταρικούς τύπους. Οι κυτταρικοί μηχανισμοί συχνά διαταράσσονται στα καρκινικά κύτταρα, τα οποία παρουσιάζουν χαρακτηριστικά των βλαστικών κυττάρων και στοιχεία αποδιαφοροποίησης. Συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί ότι, πολλές σηματοδοτικές οδοί που μεταλλάχθηκαν σε καρκινικά κύτταρα, επηρεάζουν το σχηματισμό των iPSCs, παρουσιάζοντας ομοιότητες μεταξύ της ογκογένεσης και του κυτταρικού επαναπρογραμματισμού.

Συμπερασματικά, παρά τις πολυάριθμες τεχνολογικές εξελίξεις στην παραγωγή ανθρώπινων iPSCs, σχετικά λίγα είναι γνωστά αναφορικά με τη μοριακή και λειτουργική τους ισοδυναμία με τα κύτταρα ES, τα οποία ενδέχεται τελικά να επηρεάσουν την πιθανή κλινική χρησιμότητά τους. Για την απάντηση αυτών των ερωτημάτων απαιτείται η ανάλυση της γονιδιωματικής και επιγενωμικής ακεραιότητας των ανθρώπινων iPSCs, καθώς και η ανάπτυξη νέων πρωτοκόλλων διαφοροποίησης και αξιόπιστων δοκιμασιών για την αξιολόγηση της λειτουργικότητας των εξειδικευμένων κυττάρων που προέρχονται από τα iPSCs.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aasen, Trond, Angel Raya, Maria J. Barrero, Elena Garreta, Antonella Consiglio, Federico Gonzalez, Rita Vassena, Josipa Bilić, Vladimir Pekarik, Gustavo Tiscornia, Michael Edel, Stéphanie Boué, and Juan Carlos Izpisúa Belmonte. 2008. “Efficient and Rapid Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from Human Keratinocytes.” *Nature Biotechnology* 26(11): 1276–84.
- Aoi, Takashi, Kojiro Yae, Masato Nakagawa, Tomoko Ichisaka, Keisuke Okita, Kazutoshi Takahashi, Tsutomu Chiba, and Shinya Yamanaka. 2008. “Generation of Pluripotent Stem Cells from Adult Mouse Liver and Stomach Cells.” *Science* 321(5889): 699–702.
- Bar-Nur, Ori, Inbal Caspi, Nissim Benvenisty, Rachel Eiges, Achia Urbach, Mira Malcov, Tsvia Frumkin, Tamar Schwartz, Ami Amit, Yuval Yaron, Amir Eden, Ofra Yanuka, Nissim Benvenisty, and Dalit Ben-Yosef. 2012. “Molecular Analysis of FMR 1 Reactivation in Fragile-X Induced Pluripotent Stem Cells and Their Neuronal Derivatives.” *Journal of Molecular Cell Biology* 1(5): 1–4.
- Bar, Shiran, and Nissim Benvenisty. 2019. “Epigenetic Aberrations in Human Pluripotent Stem Cells.” *The EMBO Journal* 38(12): 1–18.
- Barau, Joan, Aurélie Teissandier, Natasha Zamudio, Stéphanie Roy, Valérie Nalesso, Yann Héroult, Florian Guillou, and Déborah Bourc’h. 2016. “The DNA Methyltransferase DNMT3C Protects Male Germ Cells from Transposon Activity.” *Science* 354(6314): 909–12.
- Bektik, Emre, Adrienne Dennis, Gary Pawlowski, Chen Zhou, Danielle Maleski, Satoru Takahashi, Kenneth R. Laurita, Isabelle Deschênes, and Ji Dong Fu. 2018. “S-Phase Synchronization Facilitates the Early Progression of Induced-Cardiomyocyte Reprogramming through Enhanced Cell-Cycle Exit.” *International Journal of Molecular Sciences* 19(5).
- Bilic, Josipa, and Juan Carlos Izpisua Belmonte. 2012. “Concise Review: Induced Pluripotent Stem Cells versus Embryonic Stem Cells: Close Enough or yet Too Far Apart?” *Stem Cells* 30(1): 33–41.
- Blelloch, Robert, Monica Venere, Jonathan Yen, and Miguel Ramalho-Santos. 2007. “Generation of Induced Pluripotent Stem Cells in the Absence of Drug Selection.” *Cell Stem Cell* 1(3): 245–47.

- Bock, Christoph, Eleni M. Tomazou, Arie B. Brinkman, Fabian Müller, Femke Simmer, Hongcang Gu, Natalie Jäger, Andreas Gnirke, Hendrik G. Stunnenberg, and Alexander Meissner. 2010. "Quantitative Comparison of Genome-Wide DNA Methylation Mapping Technologies." *Nature Biotechnology* 28(10): 1106–14.
- Boland, Michael J., Jennifer L. Hazen, Kristopher L. Nazor, Alberto R. Rodriguez, Wesley Gifford, Greg Martin, Sergey Kupriyanov, and Kristin K. Baldwin. 2009. "Adult Mice Generated from Induced Pluripotent Stem Cells." *Nature* 461(7260): 91–94.
- Bostick, Magnolia, Kyong Kim Jong, Pierre Olivier Estève, Amander Clark, Sriharsa Pradhan, and Steven E. Jacobsen. 2007. "UHRF1 Plays a Role in Maintaining DNA Methylation in Mammalian Cells." *Science* 317(5845): 1760–64.
- Chin, Mark H., Matteo Pellegrini, Kathrin Plath, and William E. Lowry. 2010. "Molecular Analyses of Human Induced Pluripotent Stem Cells and Embryonic Stem Cells." *Cell Stem Cell* 7(2): 263–69.
- Collier, Amanda J., and Peter J. Rugg-Gunn. 2018. "Identifying Human Naïve Pluripotent Stem Cells – Evaluating State-Specific Reporter Lines and Cell-Surface Markers." *BioEssays* 40(5): 1–12.
- Deng, Jie, Robert Shoemaker, Bin Xie, Athurva Gore, Emily M. Leproust, Jessica Antosiewicz-Bourget, Dieter Egli, Nimet Maherali, In Hyun Park, Junying Yu, George Q. Daley, Kevin Eggan, Konrad Hochedlinger, James Thomson, Wei Wang, Yuan Gao, and Kun Zhang. 2009. "Targeted Bisulfite Sequencing Reveals Changes in DNA Methylation Associated with Nuclear Reprogramming." *Nature Biotechnology* 27(4): 353–60.
- Doi, Akiko, In Hyun Park, Bo Wen, Peter Murakami, Martin J. Aryee, Rafael Irizarry, Brian Herb, Christine Ladd-Acosta, Junsung Rho, Sabine Loewer, Justine Miller, Thorsten Schlaeger, George Q. Daley, and Andrew P. Feinberg. 2009. "Differential Methylation of Tissue-and Cancer-Specific CpG Island Shores Distinguishes Human Induced Pluripotent Stem Cells, Embryonic Stem Cells and Fibroblasts." *Nature Genetics* 41(12): 1350–53.
- Efe, Jem A., Simon Hilcove, Janghwan Kim, Hongyan Zhou, Kunfu Ouyang, Gang Wang, Ju Chen, and Sheng Ding. 2011. "Conversion of Mouse Fibroblasts into Cardiomyocytes Using a Direct Reprogramming Strategy." *Nature Cell Biology* 13(3): 215–22.
- Eminli, Sarah, Adlen Foudi, Matthias Stadtfeld, Nimet Maherali, Tim Ahfeldt, Gustavo Mostoslavsky, Hanno Hock, and Konrad Hochedlinger. 2009. "Differentiation Stage

- Determines Potential of Hematopoietic Cells for Reprogramming into Induced Pluripotent Stem Cells.” *Nature Genetics* 41(9): 968–76.
- Eminli, Sarah, Jochen Utikal, Katrin Arnold, Rudolf Jaenisch, and Konrad Hochedlinger. 2008. “Reprogramming of Neural Progenitor Cells into Induced Pluripotent Stem Cells in the Absence of Exogenous Sox2 Expression.” *Stem Cells* 26(10): 2467–74.
- Epstein, Jonathan A. 2010. “Cardiac Development and Implications for Heart Disease.” *New England Journal of Medicine* 363(17): 1638–47.
- González, Federico, Stéphanie Boué, and Juan Carlos Izpisua Belmonte. 2011. “Methods for Making Induced Pluripotent Stem Cells: Reprogramming à La Carte.” *Nature Reviews Genetics* 12(4): 231–42.
- Hackett, Jamie A., and M. Azim Surani. 2013. “DNA Methylation Dynamics during the Mammalian Life Cycle.” *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 368(1609): 1–8.
- Hochedlinger, Konrad, and Rudolf Jaenisch. 2015. “Induced Pluripotency and Epigenetic Reprogramming.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7(12): 1–27.
- Huang, Kevin, Yin Shen, Zhigang Xue, Marina Bibikova, Craig April, Zhenshan Liu, Linzhao Cheng, Andras Nagy, Matteo Pellegrini, Jian Bing Fan, and Guoping Fan. 2014. “A Panel of CpG Methylation Sites Distinguishes Human Embryonic Stem Cells and Induced Pluripotent Stem Cells.” *Stem Cell Reports* 2(1): 36–43.
- Huangfu, Danwei, Kenji Osafune, René Maehr, Wenjun Guo, Astrid Eijkelenboom, Shuibing Chen, Whitney Muhlestein, and Douglas A. Melton. 2008. “Induction of Pluripotent Stem Cells from Primary Human Fibroblasts with Only Oct4 and Sox2.” *Nature Biotechnology* 26(11): 1269–75.
- Hussein, Samer M. et al. 2011. “Copy Number Variation and Selection during Reprogramming to Pluripotency.” *Nature* 471(7336): 58–62.
- Ieda, Masaki, Ji-Dong Fu, Paul Delgado-Olguin, Vasanth Vedantham, Yohei Hayashi, Benoit G Bruneau, and Deepak Srivastava. 2010. “Direct Reprogramming of Fibroblasts into Functional Cardiomyocytes by Defined Factors.” *Cell* 142(3): 375–86.
- Iurlaro, Mario, Ferdinand von Meyenn, and Wolf Reik. 2017. “DNA Methylation Homeostasis in Human and Mouse Development.” *Current Opinion in Genetics and Development* 43(1): 101–9.



- Konki, Mikko, Kalyan Pasumarthy, Maia Malonzo, Annele Sainio, Cristina Valensisi, Mirva Söderström, Maheswara Reddy Emani, Aki Stubb, Elisa Närvä, Bishwa Ghimire, Asta Laiho, Hannu Järveläinen, Riitta Lahesmaa, Harri Lähdesmäki, R. David Hawkins, and Riikka J. Lund. 2016. "Epigenetic Silencing of the Key Antioxidant Enzyme Catalase in Karyotypically Abnormal Human Pluripotent Stem Cells." *Scientific Reports* 6(June 2015): 1–8.
- Leitch, Harry G., Kirsten R. McEwen, Aleksandra Turp, Vesela Encheva, Tom Carroll, Nils Grabole, William Mansfield, Buhe Nashun, Jaysen G. Knezovich, Austin Smith, M. Azim Surani, and Petra Hajkova. 2013. "Naive Pluripotency Is Associated with Global DNA Hypomethylation." *Nature Structural and Molecular Biology* 20(3): 311–16.
- Li, En. 2002. "Chromatin Modification and Epigenetic Reprogramming in Mammalian Development." *Nat Rev Genet* (September): 662–73.
- Li, Wenlin, Wei Wei, Saiyong Zhu, Jinliang Zhu, Yan Shi, Tongxiang Lin, Ergeng Hao, Alberto Hayek, Hongkui Deng, and Sheng Ding. 2009. "Generation of Rat and Human Induced Pluripotent Stem Cells by Combining Genetic Reprogramming and Chemical Inhibitors." *Cell Stem Cell* 4(1): 16–19.
- Liao, Jing, Rahul Karnik, Hongcang Gu, Michael J. Ziller, Kendell Clement, Alexander M. Tsankov, Veronika Akopian, Casey A. Gifford, Julie Donaghey, Christina Galonska, Ramona Pop, Deepak Reyon, Shengdar Q. Tsai, William Mallard, J. Keith Joung, John L. Rinn, Andreas Gnirke, and Alexander Meissner. 2015. "Targeted Disruption of DNMT1, DNMT3A and DNMT3B in Human Embryonic Stem Cells." *Nature Genetics* 47(5): 469–78.
- Lister, Ryan, Mattia Pelizzola, Robert H. Downen, R. David Hawkins, Gary Hon, Julian Tonti-Filippini, Joseph R. Nery, Leonard Lee, Zhen Ye, Que Minh Ngo, Lee Edsall, Jessica Antosiewicz-Bourget, Ron Stewart, Victor Ruotti, A. Harvey Millar, James A. Thomson, Bing Ren, and Joseph R. Ecker. 2009. "Human DNA Methylomes at Base Resolution Show Widespread Epigenomic Differences." *Nature* 462(7271): 315–22.
- Liu, Haisong, Fangfang Zhu, Jun Yong, Pengbo Zhang, Pingping Hou, Honggang Li, Wei Jiang, Jun Cai, Meng Liu, Kai Cui, Xiuxia Qu, Tingting Xiang, Danyu Lu, Xiaochun Chi, Ge Gao, Weizhi Ji, Mingxiao Ding, and Hongkui Deng. 2008. "Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from Adult Rhesus Monkey Fibroblasts." *Cell Stem Cell* 3(6): 587–90.

- Lund, Riikka J., Elisa Närvä, and Riitta Lahesmaa. 2012. “Genetic and Epigenetic Stability of Human Pluripotent Stem Cells.” *Nature reviews. Genetics* 13(10): 732–44.
- McLean, Cory Y., Dave Bristor, Michael Hiller, Shoa L. Clarke, Bruce T. Schaar, Craig B. Lowe, Aaron M. Wenger, and Gill Bejerano. 2010. “GREAT Improves Functional Interpretation of Cis-Regulatory Regions.” *Nature Biotechnology* 28(5): 495–501.
- Meissner, Alexander, Marius Wernig, and Rudolf Jaenisch. 2007. “Direct Reprogramming of Genetically Unmodified Fibroblasts into Pluripotent Stem Cells.” *Nature Biotechnology* 25(10): 1177–81.
- Miura, Kyoko, Yohei Okada, Takashi Aoi, Aki Okada, Kazutoshi Takahashi, Keisuke Okita, Masato Nakagawa, Michiyo Koyanagi, Koji Tanabe, Mari Ohnuki, Daisuke Ogawa, Eiji Ikeda, Hideyuki Okano, and Shinya Yamanaka. 2009. “Variation in the Safety of Induced Pluripotent Stem Cell Lines.” *Nature Biotechnology* 27(8): 743–45.
- Muzny, Donna M. et al. 2012. “Comprehensive Molecular Characterization of Human Colon and Rectal Cancer.” *Nature* 487(7407): 330–37.
- Narazaki, Genta, Hideki Uosaki, Mizue Teranishi, Keisuke Okita, Bongju Kim, Satoshi Matsuoka, Shinya Yamanaka, and Jun K. Yamashita. 2008. “Directed and Systematic Differentiation of Cardiovascular Cells from Mouse Induced Pluripotent Stem Cells.” *Circulation* 118(5): 498–506.
- Nazor, Kristopher L. et al. 2012. “Recurrent Variations in DNA Methylation in Human Pluripotent Stem Cells and Their Differentiated Derivatives.” *Cell Stem Cell* 10(5): 620–34.
- Nishino, Koichiro, Masashi Toyoda, Mayu Yamazaki-Inoue, Yoshihiro Fukawatase, Emi Chikazawa, Hironari Sakaguchi, Hidenori Akutsu, and Akihiro Umezawa. 2011. “DNA Methylation Dynamics in Human Induced Pluripotent Stem Cells over Time.” *PLoS Genetics* 7(5).
- Nishino, Koichiro, and Akihiro Umezawa. 2016. “DNA Methylation Dynamics in Human Induced Pluripotent Stem Cells.” *Human Cell* 29(3): 97–100.
- Okano, Masaki, Daphne W. Bell, Daniel A. Haber, and En Li. 1999. “DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b Are Essential for de Novo Methylation and Mammalian Development.” *Cell* 99(3): 247–57.
- Okita, Keisuke, Tomoko Ichisaka, and Shinya Yamanaka. 2007. “Generation of Germline-

- Competent Induced Pluripotent Stem Cells.” *Nature* 448(7151): 313–17.
- Park, In Hyun, Rui Zhao, Jason A. West, Akiko Yabuuchi, Hongguang Huo, Tan A. Ince, Paul H. Lerou, M. William Lensch, and George Q. Daley. 2008. “Reprogramming of Human Somatic Cells to Pluripotency with Defined Factors.” *Nature* 451(7175): 141–46.
- Planello, Aline C., Junfeng Ji, Vivek Sharma, Rajat Singhania, Faridah Mbabaali, Fabian Müller, Javier A. Alfaro, Christoph Bock, Daniel D. De Carvalho, and Nizar N. Batada. 2014. “Aberrant DNA Methylation Reprogramming during Induced Pluripotent Stem Cell Generation Is Dependent on the Choice of Reprogramming Factors.” *Cell Regeneration* 3(1): 3:4.
- Polo, Jose M., Susanna Liu, Maria Eugenia Figueroa, Warakorn Kulalert, Sarah Eminli, Kah Yong Tan, Effie Apostolou, Matthias Stadtfeld, Yushan Li, Toshi Shioda, Sridaran Natesan, Amy J. Wagers, Ari Melnick, Todd Evans, and Konrad Hochedlinger. 2010. “Cell Type of Origin Influences the Molecular and Functional Properties of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells.” *Nature Biotechnology* 28(8): 848–55.
- Reik, Wolf. 2007. “Stability and Flexibility of Epigenetic Gene Regulation in Mammalian Development.” *Nature* 447(May): 425–32.
- Rothbart, Scott B., Krzysztof Krajewski, Nataliya Nady, Wolfram Tempel, Sheng Xue, Aimee I. Badeaux, Dalia Barsyte-Lovejoy, Jorge Y. Martinez, Mark T. Bedford, Stephen M. Fuchs, Cheryl H. Arrowsmith, and Brian D. Strahl. 2012. “Association of UHRF1 with Methylated H3K9 Directs the Maintenance of DNA Methylation.” *Nature Structural and Molecular Biology* 19(11): 1155–60.
- Rugg-Gunn, Peter J., Anne C. Ferguson-Smith, and Roger A. Pedersen. 2005. “Epigenetic Status of Human Embryonic Stem Cells.” *Nature Genetics* 37(6): 585–87.
- Rugg-Gunn, Peter J., Anne C. Ferguson-Smith, Roger A. Pedersen, Peter J. Rugg-Gunn, Anne C. Ferguson-Smith, and Roger A. Pedersen. 2007. “Status of Genomic Imprinting in Human Embryonic Stem Cells as Revealed by a Large Cohort of Independently Derived and Maintained Lines.” *Human Molecular Genetics* 16(R2): 243–51.
- Ruiz, Sergio, Dinh Diep, Athurva Gore, Athanasia D. Panopoulos, Nuria Montserrat, Nongluk Plongthongkum, Sachin Kumar, Ho Lim Fung, Alessandra Giorgetti, Josipa Bilic, Erika M. Batchelder, Holm Zaehres, Natalia G. Kan, Hans Robert Schöler, Mark Mercola, Kun Zhang, and Juan Carlos Izpisua Belmonte. 2012. “Identification of a Specific

- Reprogramming-Associated Epigenetic Signature in Human Induced Pluripotent Stem Cells.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(40): 16196–201.
- Shiota, Kunio, Yasushi Kogo, Jun Ohgane, Takuya Imamura, Atsushi Urano, Koichiro Nishino, Satoshi Tanaka, and Naka Hattori. 2002. “Epigenetic Marks by DNA Methylation Specific to Stem , Germ and Somatic Cells in Mice.” *Genes Cells* 7(9): 961–69.
- Smith, Zachary D., and Alexander Meissner. 2013. “DNA Methylation: Roles in Mammalian Development.” *Nature Reviews Genetics* 14(3): 204–20.
- Smith, Zachary D., Camille Sindhu, and Alexander Meissner. 2016. “Molecular Features of Cellular Reprogramming and Development.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 17(3): 139–54.
- Stadtfeld, Matthias, Effie Apostolou, Hidenori Akutsu, Atsushi Fukuda, Patricia Follett, Sridaran Natesan, Tomohiro Kono, Toshi Shioda, and Konrad Hochedlinger. 2010. “Aberrant Silencing of Imprinted Genes on Chromosome 12qF1 in Mouse Induced Pluripotent Stem Cells.” *Nature* 465(7295): 175–81.
- Stadtfeld, Matthias, Kristen Brennand, and Konrad Hochedlinger. 2008. “Reprogramming of Pancreatic  $\beta$  Cells into Induced Pluripotent Stem Cells.” *Current Biology* 18(12): 890–94.
- Takahashi, Kazutoshi, Koji Tanabe, Mari Ohnuki, Megumi Narita, Tomoko Ichisaka, Kiichiro Tomoda, and Shinya Yamanaka. 2007. “Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors.” *Cell* 131(5): 861–72.
- Takahashi, Kazutoshi, and Shinya Yamanaka. 2006. “Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors.” *Cell* 126(4): 663–76.
- Theunissen, Thorold W. et al. 2016. “Molecular Criteria for Defining the Naive Human Pluripotent State.” *Cell Stem Cell* 19(4): 502–15.
- Utikal, Jochen, Nimet Maherali, Warakorn Kulalert, and Konrad Hochedlinger. 2009. “Sox2 Is Dispensable for the Reprogramming of Melanocytes and Melanoma Cells into Induced Pluripotent Stem Cells.” *Journal of Cell Science* 122(19): 3502–10.
- Weissbein, Uri, Omer Plotnik, Dan Vershkov, and Nissim Benvenisty. 2017. “Culture-Induced Recurrent Epigenetic Aberrations in Human Pluripotent Stem Cells.” *PLoS Genetics*

13(8): 1–16.

- Wernig, Marius, Alexander Meissner, Ruth Foreman, Tobias Brambrink, Manching Ku, Konrad Hochedlinger, Bradley E. Bernstein, and Rudolf Jaenisch. 2007. “In Vitro Reprogramming of Fibroblasts into a Pluripotent ES-Cell-like State.” *Nature* 448(7151): 318–24.
- Yamanaka, Shinya. 2009. “A Fresh Look at IPS Cells.” *Cell* 137(1): 13–17.
- Yu, Junying, Maxim A. Vodyanik, Kim Smuga-Otto, Jessica Antosiewicz-Bourget, Jennifer L. Frane, Shulan Tian, Jeff Nie, Gudrun A. Jonsdottir, Victor Ruotti, Ron Stewart, Igor I. Slukvin, and James A. Thomson. 2007. “Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells.” *Science* 318(5858): 1917–20.
- Zhao, Xiao Yang, Wei Li, Zhuo Lv, Lei Liu, Man Tong, Tang Hai, Jie Hao, Chang Long Guo, Qing Wen Ma, Liu Wang, Fanyi Zeng, and Qi Zhou. 2009. “IPS Cells Produce Viable Mice through Tetraploid Complementation.” *Nature* 461(7260): 86–90.
- Ziller, Michael J., Fabian Müller, Jing Liao, Yingying Zhang, Hongcang Gu, Christoph Bock, Patrick Boyle, Charles B. Epstein, Bradley E. Bernstein, Thomas Lengauer, Andreas Gnirke, and Alexander Meissner. 2011. “Genomic Distribution and Inter-Sample Variation of Non-CpG Methylation across Human Cell Types.” *PLoS Genetics* 7(12).